

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

TUBES PLATS POUR SÉPARATION ET CULTURE MASSIVE DES MICROBES

par RENÉ LEGROUX.

Une des opérations les plus courantes en bactériologie consiste à extraire les divers germes qui peuvent coexister dans un produit, à en obtenir la culture, ce qui permet d'établir la nature et la quantité des microbes contenus dans le produit.

La première méthode de séparation, la méthode des plaques de Koch, consistait à incorporer à un milieu liquide solidifiable le mélange microbien, puis à examiner et dénombrer les colonies développées à la surface et dans la profondeur du milieu. D'autres fois, on épuisait le produit de ses germes en déposant la semence par stries parallèles à la surface du milieu nutritif. Dans les deux cas, les plaques superposées et enfermées sous de larges cloches étaient fréquemment contaminées et leur milieu séchait rapidement; l'emploi des tubes à essai des chimistes (laboratoire de Pasteur), ainsi que le remplacement de la gélatine par la gélose pour gélifier les liquides (1),

(1) Les milieux gélifiés ont été employés au laboratoire de Pasteur vers l'année 1882. A cette époque, on y employait de petits cristallisoirs de 7 centimètres de diamètre à couvercle rodé en rainure, le pourtour du cristallisoir était percé d'une ouverture circulaire bouchée au coton. Après avoir coulé un milieu nutritif dans le fond du cristallisoir, la surface en étaitensemencée par l'orifice latéral (communication orale de M. Roux).

constitua un progrès considérable sur la méthode de séparation de Koch. Le tube à essai permettait le filtrage de l'air à travers une bourre de coton et la conservation du milieu nutritif dans le récipient où avait lieu sa stérilisation; il facilitait la « pureté bactériologique » au cours des manipulations. Cependant lorsque parurent les boîtes de Pétri, leur usage se généralisa dans les laboratoires du monde entier; parce que la surface utile du milieu était large et facile à explorer.

A côté de ces avantages les boîtes de Pétri ont aussi leurs inconvénients :

AVANTAGES. — Large surface nutritive, d'une épaisseur uniforme, facilement accessible, d'où commodité pour examiner, même au microscope, les colonies développées.

INCONVÉNIENTS. — Contamination presque fatale du milieu après quelques jours; dessiccation certaine; encombrement de l'appareil, constitué par deux pièces, mise hors d'usage par le bris ou la perte d'une pièce, prix élevé; impossibilité d'y préparer à l'avance des milieux; difficulté de les transporter stérilement, même vides.

La fabrication des boîtes de Pétri n'existait pas en France avant 1914. Au début de 1915, plusieurs verreries (1) furent sollicitées par l'Institut Pasteur de fabriquer ces boîtes pour les laboratoires de l'Armée; cependant nous avons cherché à leur substituer un appareil plus commode et de fabrication plus facile. Nous avons voulu garder les avantages de surface et d'épaisseur uniforme de milieu que l'on possède avec les boîtes de Pétri, mais en donnant à notre appareil ce qui manquait à celle-ci. L'usine Lalique put mener à bien la fabrication d'une boîte triangulaire (fig. 4) de 54 centimètres carrés de surface alors que la boîte de 10 centimètres de diamètre en a 58. Elle possède un goulot que l'on bouche à l'ouate et qui peut être occlus par un capuchon de caoutchouc; sa forme triangulaire permet l'accès en tous les points à l'anse de platine ou à l'effilure de pipette. Son prix de revient est bien moindre que celui de la boîte de Pétri, enfin sa fabrication régulière était assurée par un mou-

(1) Cristalleries de Sèvres. Usine Lalique, Combs-la-Ville. Verreries de Souvigny (Allier).

lage fixe, unique. Cette boîte a des inconvénients qui ne peuvent pas la faire adopter pour le but cherché, elle est plus épaisse que la boîte de Pétri, plus encombrante, malgré le plat qui permet de la soer verticalement, et surtout ses deux angles inférieurs sont trop fragiles, le verre

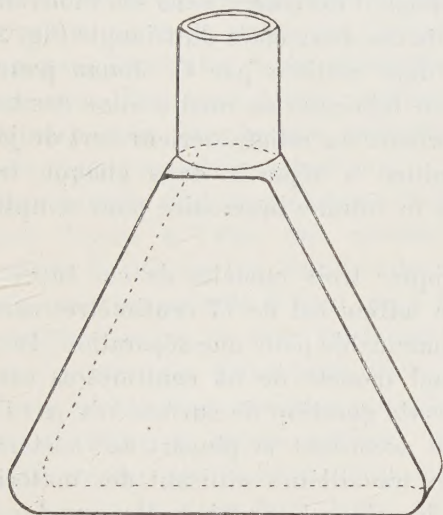


fig. 1

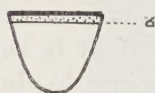


fig. 2

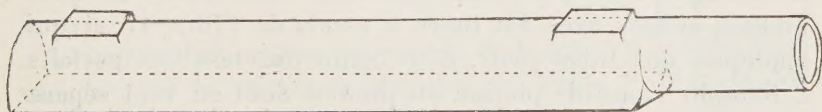
Gr. $\frac{1}{2}$ nature

fig. 3

ne s'étend pas en ces deux points lors du moulage de la pièce.

Nous croyons avoir paré à ces inconvénients et avoir acquis de nouveaux avantages sur la boîte de Pétri et la boîte triangulaire, avec le modèle de tube plat représenté par la figure 3.

Ces tubes ont une longueur de 20 centimètres, une ouverture de 20 millimètres facile à capuchonner, la section en constitue un des principaux avantages; cette section représente un triangle isocèle à sommet arrondi (fig. 2). Une longue cuvette

à fond plat, où le milieu s'étale en une couche d'épaisseur uniforme, occupe toute la longueur du tube. Sur la face opposée au voisinage des extrémités du tube sont deux reliefs plans (fig. 3) permettant de placer à l'étuve l'appareil dès que le milieu vient d'y être étalé et ensemencé; dans cette position le milieu ne peut glisser puisqu'il est coincé dans son mouvement de descente par l'obliquité des deux côtés du triangle (fig. 2 *a*); cette disposition était déjà utilisée par C. Jouan pour les grandes boîtes qu'il a fait fabriquer en modification des boîtes de Roux. La limite supérieure du relief inférieur sert de jauge pour la quantité de milieu à répartir dans chaque tube; cette hauteur représente le volume nécessaire pour remplir la cuvette plane.

Nous avons fait fabriquer trois modèles de ces tubes, un petit dont la surface de milieu est de 17 centimètres carrés; le moyen, le plus recommandable pour une séparation, 46 centimètres carrés; le grand modèle de 64 centimètres carrés. J'estime cependant que cette question de surface n'a pas l'importance capitale que lui accordent la plupart des bactériologistes; il arrive que deux travailleurs utilisant des matériaux identiques, l'un obtient des séparations très nettes sur des surfaces de 17 centimètres alors que l'autre couvre de colonies confluentes une surface de 64 centimètres.

La technique de l'ensemencement assure seule le bon résultat d'une séparation. Voici celle qui nous sert depuis de nombreuses années avec les tubes à essais de 170×17 et qui, appliquée aux tubes plats, nous donne des résultats parfaits.

Remplir l'anse de platine du produit dont on veut séparer les microbes (matières fécales, pus, etc.), la porter au fond du tube, l'essuyer avec insistance à ce niveau sur une étendue d'environ 2 centimètres du milieu nutritif (fig. 4 *a*), puis soulever l'anse, la reporter à quelques millimètres en deçà (fig. 4 *b*) pour tracer, par un mouvement lent jusqu'à l'orifice du tube, une ligne ininterrompue de zigzags très rapprochés sans craindre de repasser deux ou trois fois sur la même ligne (fig. 3 *c*). Par ce procédé la plus grande partie du produit bactérifère est déposée sur la portion inférieure du milieu et le reste de la surface est ensemencé de telle sorte que les divers germes donnent des colonies séparées les unes des

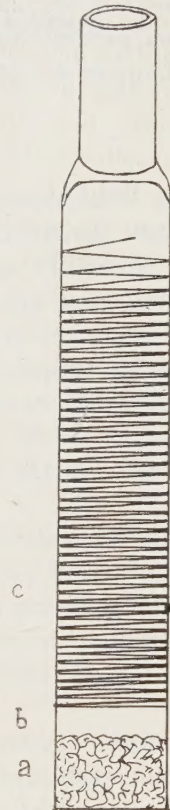
autres. Après seize à dix-huit heures d'étuve à 37°, les premières stries présentent des colonies confluentes, mais les stries suivantes donnent des colonies isolées.

Il est inutile de diluer le produit bactérifère que l'on doit examiner; du reste, la dilution est une méthode de choix qui permet d'isoler une espèce déterminée de toute autre qui l'accompagne, ce qui va à l'encontre de la séparation bactérienne qui, elle, tend à faire connaître non seulement tous les germes présents, mais encore leur proportion respective.

Dans ce tube plat la technique de la séparation s'opère à l'abri des contaminations venant de l'extérieur : la visibilité des colonies développées est parfaite à l'œil nu, à la loupe ou au microscope; le tube est facile à transporter; il n'est pas encombrant dans l'étuve; son prix est trois fois moindre que celui d'une boîte de Pétri de même surface; la quantité de milieu est moindre d'un quart que celle employée dans une boîte de Pétri. Le grand avantage de ce tube est de pouvoir conserver les milieux nutritifs le plus longtemps possible à l'abri des souillures et de la dessiccation par suite du capuchonnage.

La surface du milieu est commode à ensemer; j'ai vu des bactériologistes peu expérimentés, ayant à rechercher le méningocoque dans le mucus rhino-pharyngé, employer ces tubes pour la première fois et obtenir plus de 80 p. 100 de leurs tubes (sur 350) avec des colonies isolées; les milieux avaient étéensemencés avec le tampon de coton de l'attouchement.

Enfin par la solidité de leurs parois ces tubes supportent le vide, ils se prêtent donc parfaitement aux cultures sur milieux solides des anaérobies les plus stricts; il suffit pour cela de fermer l'ouverture au-dessus du tampon de coton avec un bouchon de caoutchouc percé d'un trou traversé par un tube de



Gr. $\frac{1}{2}$ nature

FIGURE 4.

verre à étranglement qui est scellé à la fin des opérations.

Tous les milieux solidifiables peuvent être employés dans ces tubes; une des applications les plus intéressantes est d'y coaguler le sérum pour la recherche du bacille diphtérique; un seul de ces tubes est suffisant pour obtenir des colonies espacées en partant de la fausse membrane prélevée au moyen d'un tampon de coton.

DE L'IMPORTANCE DE LA VOIE RESPIRATOIRE DANS LA PRODUCTION DES ANTICORPS

par W. PFENNINGER (Zurich).

C'est au cours de ses recherches sur l'anaphylaxie que M. Besredka a, le premier, pratiqué les injections intratrachéales, méthode à laquelle on n'avait pas l'habitude de recourir. Il a pu constater (1) que, comparée aux voies intrapéritonéale et intraveineuse, la voie respiratoire est aussi accessible sinon plus; les lapins et les cobayes supportent des doses considérables de sérum sans présenter le moindre trouble; que le choc anaphylactique peut être déclenché chez les cobayes aussi bien par la voie aérienne que par la veine ou par la voie cérébrale.

Le pouvoir d'absorption de la muqueuse respiratoire à l'égard des sérums thérapeutiques étant considérable, des lapins et des cobayes, qui reçoivent des sérums spécifiques par la trachée, sont rapidement immunisés et peuvent supporter dans la suite des doses 30, 50 fois mortelles de toxine diphtérique et tétanique.

Besredka (2) a, en outre, constaté que, lorsqu'il s'agit de toxines et de poisons solubles, qu'ils soient administrés par la voie intraveineuse ou par la voie respiratoire, leur action est la même et s'exerce avec la même promptitude. Vis-à-vis des éléments figurés, la couche épithéliale se comporte, par contre, comme un filtre qui, à mesure que la solubilisation se produit, leur permet de pénétrer lentement par la muqueuse.

Cet auteur a démontré qu'injecté par la voie trachéale, l'animal supporte une dose de virus paratyphique au moins 50 fois supérieure à celle que comporte sa résistance normale; mais qu'une injection préalable par la trachée de 1/2 cent.

(1) *Ces Annales*, 34, 1920, p. 51.

(2) *Ces Annales*, 34, 1920, p. 361.

cube d'une solution de bile de bœuf au 1/20, peut renverser la barrière, opposée normalement par la muqueuse aux virus, le paratyphique B, par exemple; la résistance d'un animal ainsi préparé est diminuée au moins de cinq fois à l'égard de ce virus.

Besredka a réussi, en plus, à créer l'immunité locale de l'appareil respiratoire: choisissant le bacille diphtérique qui ne donne lieu ni à la production d'anticorps, ni à la production d'une immunité active, il est arrivé à protéger le cobaye contre la dose mortelle dans la trachée en le vaccinant par cette voie.

La voie aérienne est surtout avantageuse quand il s'agit d'établir une production abondante d'anticorps. Besredka a démontré notamment le fait très important que, par l'injection intra trachéale de l'antigène tuberculeux à l'œuf, on arrive facilement à produire une quantité abondante et très durable d'anticorps, décelables par la réaction de fixation de Bordet-Gengou.

Les questions qui se posèrent à la suite de ces recherches de Besredka étaient les suivantes :

1° Est-il possible de produire des anticorps, en général, en injectant de l'antigène dans la trachée ?

2° Quel degré de susceptibilité présente la voie respiratoire à l'égard des antigènes déterminés ? Est-il possible de produire des anticorps en quantité suffisante ? Comment se comporte à cet égard la voie trachéale comparativement à la voie sanguine ou péritonéale ?

3° Comment les animaux injectés par la voie aérienne se comportent-ils au point de vue de l'immunité acquise, active ou passive, comparativement à ceux injectés par la veine ou par le péritoine ?

Les recherches suivantes ont pour but de répondre à ces questions.

*
* *

Avant d'exposer nos expériences, il nous paraît utile de donner un aperçu sur le pouvoir de résorption de la muqueuse respiratoire. Cette muqueuse, très étendue, très fine et très

vasculaire, absorbe, en général, avec une extrême activité; elle tient sous ce rapport le premier rang parmi les surfaces libres de l'organisme. Elle est le lieu d'élection pour l'absorption des substances volatiles, en général; elle montre la même disposition à l'égard des substances liquides ou solubles, comme le prouvent maintes observations faites sur les animaux.

Goodwin, Ségallas, Mayer (1), ont constaté que l'eau, injectée dans la trachée du chien et du lapin, disparaît presque instantanément par absorption. Gohier et ses élèves ont pu introduire de 30 à 40 litres d'eau dans la trachée du cheval avant de provoquer la mort; à l'autopsie, pratiquée immédiatement après, ils ont pu constater que tout le liquide avait été absorbé. Colin (2) a fait couler 18 litres d'eau pendant trois heures dans la trachée d'un cheval sans le gêner considérablement. Le pouvoir de résorption de la muqueuse respiratoire à l'égard des médicaments, sous forme de gaz, est bien connue et on l'utilise dans la pratique pour provoquer l'anesthésie. Les sels solubles s'absorbent aussi très facilement; les sels de strychnine déterminent chez le chien la mort en cinq ou six minutes après l'injection intratrachéale (Mayer). Colin a retrouvé ce sel dans le sang de la veine jugulaire d'un cheval, quatre minutes après l'injection intratrachéale. Le curare, non absorbé dans l'intestin, passe facilement par la muqueuse respiratoire.

Tout récemment, Guieysse-Pellissier (3) a étudié l'absorption de l'huile d'olive dans les poumons du lapin et du chien; il a pu démontrer qu'elle s'y effectue par les cellules épithéliales alvéolaires.

La technique des injections intratrachéales employée dans nos expériences sur le lapin et le cobaye est très simple. On fixe les animaux sur la table d'opération. Après avoir nettoyé le champ d'opération, on pratique au niveau de la peau une incision médiane qui découvre la trachée; cette opération, très facile chez le lapin, l'est un peu moins chez le cobaye, surtout quand il est gras. On fixe la trachée avec une pince et on enfonce la pointe de la canule entre deux anneaux de cartilage. Il faut avoir soin d'injecter très lentement, sinon, une partie du liquide peut être rejetée par la toux.

L'opération terminée, on ferme la plaie par une agrafe de Michel; la plaie guérit sans aucune réaction dans l'intervalle entre deux injections.

Les cobayes supportent facilement jusqu'à 4 cent. cubes de liquide par injection, les lapins jusqu'à 10 cent. cubes; nous n'avons jamais observé d'accidents au cours de ces injections.

Pour les recherches que nous allons exposer, on a eu soin de comparer la production d'anticorps chez les animaux injectés par la trachée avec les anticorps des animaux injectés dans les veines ou dans le péritoine.

Nos recherches portent sur les agglutinines, les précipitines, les hémolysines, les bactériolysines, les bactéricidines et sur l'immunité active et passive.

(1) et (2) Cités d'après COLIN: *Traité de physiologie comparée des animaux*, 2 Paris 1888.

(3) Résumés des communications et des démonstrations du Congrès de Physiologie. Paris, 16, 20 juillet 1920.

A. — ANTICORPS

I. — Agglutinines.

Il a été employé pour la production de ces anticorps une culture de bacille paratyphique B avec laquelle on a inoculé quatre lapins, deux dans les veines et deux par la trachée, à intervalles de sept jours. (Voir pour les détails le

TABLEAU I. — B. paratyphique B.

LAPIN N°	POIDS initial	MODE d'injection des bacilles	1 ^{re} injection	2 ^e injection	3 ^e injection	OBSERVATIONS
82 A	gt. 2.370	Intraveineux.	29-IV, 3 h. 1/20 de culture vivante.	5-V, 3 h. 1/20 de culture morte (1 h. à 60°).	»	Succombe le 9-10/V. Perte de poids de 420 gr.
83 A	2.270	Intraveineux.	29-IV, 3 h. 1/20 de culture vivante.	6-V, 3 h. 1/20 de culture morte (1 h. à 60°).	»	Succombe le 8-V. Perte de poids 635 gr.
84 A	2.030	Intra-trachéal.	29-IV, 3 h. 1/20 de culture vivante.	6-V, 3 h. 1/20 de culture morte (1 h. à 60°).	13-V, 10 h. 1/10 de culture vivante.	Poids le 15-VI 2.480 gr.
99 A	1.570	Intra-trachéal.	29-IV, 3 h. 1/20 de culture vivante.	6-V, 3 h. 1/20 de culture morte (1 h. à 60°).	13-V, 10 h. 1/20 de culture vivante.	Poids le 15-VI 1.990 gr.

tableau I). L'examen des sérums était pratiqué six jours après la première et la deuxième injection, et quatre jours après la troisième.

Le *lapin* n° 82, pesant 2.370 grammes, inoculé par la veine, montre, six jours après la première inoculation, un titre de 1/800; quatre jours après la deuxième injection, un titre de 1/3.200; il meurt, après avoir perdu un sixième environ de son poids initial. A l'autopsie, on ne trouve que de l'œdème des poumons: il a dû succomber à l'infection.

Le *lapin* n° 83, pesant 2.270 grammes, inoculé par la veine, tombe aussitôt malade. Trois jours après la première inoculation, il présente un titre de 1/400; cinq jours après, un titre de 1/4.800; deux jours après la deuxième inoculation, peu avant sa mort, il atteint un titre de 1/19.200. Le résultat de l'autopsie est négatif. En sept jours, le poids de l'animal a diminué de 635 grammes.

Le lapin n° 84, d'un poids de 2.030 grammes, est inoculé par la trachée; six jours après la première inoculation, le titre est de $1/800$; quatre jours après la deuxième, il est de $1/8.000$; quatre jours après la troisième, le pouvoir agglutinant est prononcé à la dilution de $1/9.600$; le titre le plus haut $1/19.200$ est atteint onze jours après la troisième inoculation; il tombe à $1/8.000$, puis à $1/6.000$, pour arriver, après quatorze jours, à $1/4.800$.

Pendant toute la durée de l'expérience l'animal s'est bien porté; son poids a augmenté, en quarante jours, de 290 grammes.

Le lapin n° 99, pesant 1570 grammes, inoculé dans la trachée, présente un titre de $1/40$ quatre jours après la première inoculation; $1/2.400$ quatre jours

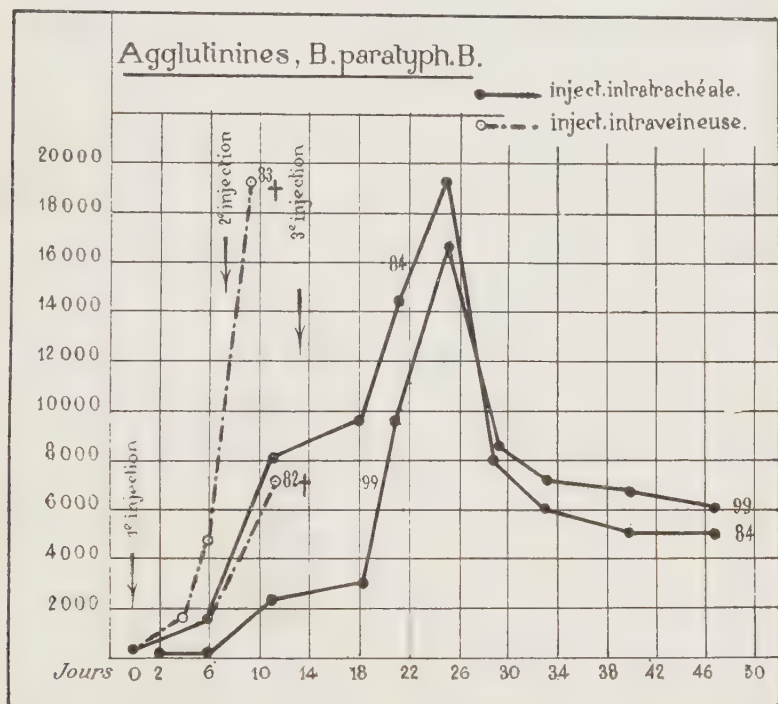


FIGURE 1.

après la deuxième et, quatre jours après la troisième, un titre de $1/3.200$. Celui-ci s'élève ensuite et, comme celui du n° 84, atteint son maximum de $1/14.400$, onze jours après la dernière inoculation. A partir de ce moment, le pouvoir agglutinant baisse peu à peu; au bout de quatorze jours le titre est de $1/7.200$.

Pendant toute la durée de l'expérience, l'animal s'est bien porté; son poids a augmenté de 210 grammes.

Cette série, dont les résultats sont graphiquement consignés dans la figure 1, montre jusqu'à l'évidence que les mêmes doses

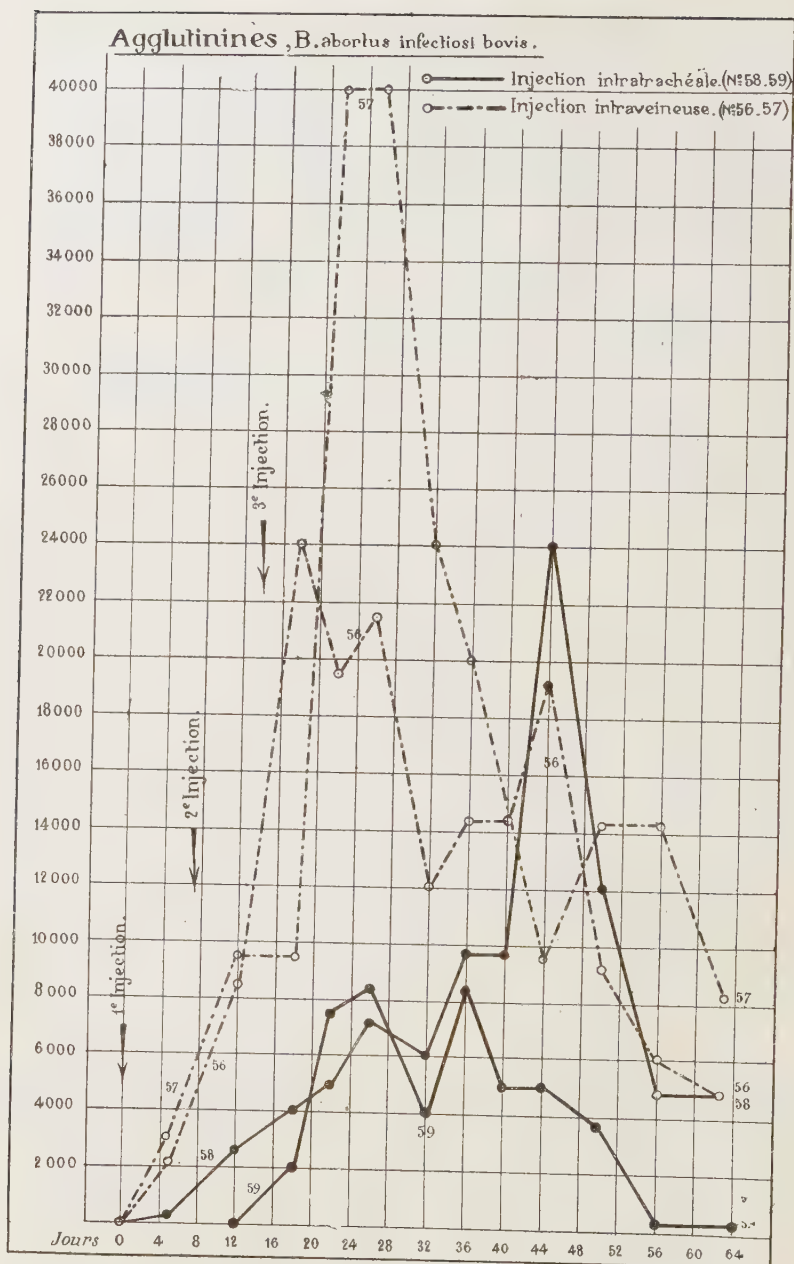


FIGURE 2.

de virus paratyphiques B sont beaucoup mieux tolérées par la voie respiratoire que par la voie sanguine : la dose de $1/20$ de culture vivante qui, par la voie veineuse, est à peu près la dose mortelle, est supportée sans le moindre inconvénient, lorsqu'elle est introduite par la voie trachéale. Cette tolérance de la voie aérienne pourra être d'une importance indéniable dans le cas où l'on aura besoin d'injecter des cultures vivantes pour produire des anticorps en grande abondance. Quant aux agglutinines obtenues par des injections trachéales, leur titre ne cède pas à celui que l'on obtient par la veine avec les mêmes doses d'antigène.

Il est un microbe qui donne, en général, des titres agglutinatifs très élevés et qui, pour cette raison, convenait particulièrement à nos expériences : c'est le bacille de l'avortement contagieux des bovidés (bacille de Bang). Nous disposons d'une culture de Belfanti, très peu virulente pour les lapins, possédant un pouvoir agglutino-gène très considérable.

Cette culture, âgée de vingt-quatre heures, fut inoculée, à doses égales, à deux lapins par la veine, puis à deux autres par la trachée. Les injections, en trois séries, de $1/20$, $1/10$ et $1/5$ d'une culture vivante, étaient pratiquées à sept jours d'intervalle (tableau II). L'examen du pouvoir agglutinant des sérums fut effectué cinq jours après les première et deuxième inoculations, quatre jours après la troisième, et ensuite, à intervalles de quatre ou six jours. La lecture des tubes était faite après un séjour de douze heures à l'étuve et de dix-huit heures à la température du laboratoire, l'agglutination se produisant très lentement avec ce microbe.

Le *lapin* n° 56 pesant 2.350 grammes, injecté par la veine, présente cinq jours après la première inoculation, un titre de $1/2.000$; cinq jours après la deuxième, un titre de $1/8.400$. Quatre jours après la troisième injection, le titre atteint son maximum avec $1/24.000$, puis il va en déclinant, non sans accuser plusieurs relèvements passagers. Quarante-deux jours après la dernière inoculation, il est à $1/6.000$.

Chez le *lapin* n° 57, pesant 2.320 grammes, injecté par la veine, le titre est de $1/2.800$ cinq jours après la première injection ; de $1/8.600$ cinq jours après la deuxième, et quatre jours après la troisième. Mais, huit jours après la troisième, il atteint son maximum $1/39.800$. Il commence à décroître le douzième jour, et le dix-huitième il retombe à $1/24.000$; le vingt-quatrième jour, il est encore à $1/14.000$.

Le *lapin* n° 58, pesant 2.330 grammes, et le n° 59, pesant 2.600 grammes, reçoivent à trois reprises et en même temps que les n°s 56 et 57, des injections par la trachée. Le bacille de Bang, administré par la voie respiratoire, paraît n'être pas assez offensif pour provoquer une abondante production d'agglutinines ; douze jours après la troisième inoculation, alors que les deux animaux injectés par la veine ont atteint un titre maximum de $1/39.800$, et de $1/24.000$,

le pouvoir agglutinant des n^{os} 58 et 59 ne présente qu'un titre de 1/7.200 et de 1/8.400. La dose massive d'une demi-culture vivante, injectée ensuite à ces deux animaux, provoque chez le n^o 58, une augmentation considérable du

TABLEAU II. — Bacille de l'avortement.

LAPIN N ^o	POIDS initial	MODE d'injection des bacilles	1 ^{re} injection	2 ^e injection	3 ^e injection	4 ^e injection	OBSERVATIONS
56	2.350	Intraveineux.	21-VI, 11 h. 1/20 de culture vivante.	28-VI, 3 h. 1/10 de culture vivante.	5-VII, 3 h. 1/5 de culture vivante.	"	Poids le 16-VIII 2.550 gr.
57	2.320	Intraveineux.	21-VI, 11 h. 1/20 de culture vivante.	28-VI, 3 h. 1/10 de culture vivante.	5-VII, 3 h. 1/5 de culture vivante.	"	Poids le 16-VIII 2.820 gr.
58	2.330	Intra-trachéal.	21-VI, 11 h. 1/20 de culture vivante.	28-VI, 3 h. 1/10 de culture vivante.	5-VIII, 3 h. 1/5 de culture vivante.	20-VIII, 5 h. 1/2 de culture vivante.	Poids le 16-VIII 2.580 gr.
59	2.600	Intra-trachéal.	21-VI, 12 h. 1/20 de culture vivante.	28-VI, 3 h. 1/10 de culture vivante.	5-VIII, 3 h. 1/5 de culture vivante.	20-VII, 5 h. 1/3 de culture vivante.	Poids le 16-VIII 2.920 gr.

titre, équivalent au titre maximum du lapin n^o 56, tandis que le n^o 59 ne réagit que faiblement.

Il résulte de ce qui précède que le bacille de Bang, peu offensif, injecté par la trachée, ne saurait déterminer une aussi abondante production d'agglutinines que lorsqu'il est injecté par la voie intraveineuse; cependant, par les injections trachéales massives, on peut atteindre un titre égal à celui qu'on obtient avec des doses moyennes intraveineuses.

II. — Précipitines.

Dans cette série d'expériences, nous avons choisi le sérum normal de cheval comme antigène.

Le lapin n^o 7, pesant 2.030 grammes, injecté par la veine, présente un titre de 1/200 six jours après la première injection, de 1/400 sept jours après la deuxième et de 1/2.000 quatre jours après la troisième. Seize jours après

cette dernière injection, il atteint son maximum, soit 1/7.200 ; à partir de là, il baisse d'abord rapidement, puis plus lentement, et cinquante-cinq jours après la dernière injection d'antigène, il est encore à 1/800. Au cours de l'expérience, c'est-à-dire en l'espace de soixante-dix jours, le poids de l'animal a augmenté de 820 grammes.

Le *lapin* n° 8, pesant 1.970 grammes, injecté par la veine, présente un titre de 1/20 six jours après la première injection, de 1/200 sept jours après la deuxième, et de 1/1.000 quatre jours après la troisième ; huit jours plus tard, il monte à 1/2.000 et retombe peu de temps après ; seize jours plus tard, il

TABLEAU III. — Sérum du cheval normal.

LAPIN N°	POIDS initial	MODE D'EMPLOI du sérum	1 ^{re} injection	2 ^e injection	3 ^e injection
7	2.030	Intraveineux . Sérum liquide.	8/V, 5 h. 3 c. c.	15/V, 3 h. 3 c. c.	23/V, 9 h. 3 c. c.
8	1.970	Intraveineux . Sérum liquide.	8/V, 5 h. 3 c. c.	15/V, 3 h. 3 c. c.	23/V, 9 h. 3 c. c.
11	2.150	Intratrachéal . Sérum liquide.	8/V, 5 h. 3 c. c.	15/V, 3 h. 3 c. c.	23/V, 9 h. 3 c. c.
23	1.820	Intratrachéal . Sérum liquide.	15/V, 3 h. 3 c. c.	23/V, 3 h. 3 c. c.	30/V, 9 h. 3 c. c.
12	1.880	Intratrachéal . Sér. sirupeux .	8/V, 5 h. 0 gr. 3	15/V, 3 h. 0 gr. 3	23/V, 9 h. 0 gr. 3
13	1.970	Intratrachéal . Sér. sirupeux .	8/V, 5 h. 0 gr. 3	15/V, 3 h. 0 gr. 3	23/V, 9 h. 0 gr. 3

est encore à 1/100. Le poids de l'animal a augmenté de 250 grammes au cours de l'expérience.

Le *lapin* n° 11, pesant 2.150 grammes, inoculé par la trachée, ne présente aucun pouvoir précipitant six jours après la première injection ; sept jours après la deuxième injection, le titre est de 1/200 ; quatre jours après la troisième, il est de 1/800 ; le douzième jour après la troisième injection, il est arrivé à son maximum de 1/2.400. Le poids du lapin a augmenté de 160 grammes.

Le *lapin* n° 23, pesant 1.820 grammes, inoculé par la trachée, présente une réaction négative sept jours après la première inoculation ; six jours après la deuxième, le titre est de 1/1.600 et déjà trois jours après la troisième, il atteint son maximum, soit 1/9.600, puis il retombe en cinq jours à 1/7.200. Le poids de l'animal avait augmenté de 600 grammes en soixante-dix jours.

Les deux derniers animaux de cette série ont été injectés avec du sérum sirupeux par la trachée, 0 gr. 3 par injection.

Chez le *lapin* n° 12, pesant 1.880 grammes, le sérum présente, six jours après la première administration, une réaction négative ; six jours après la

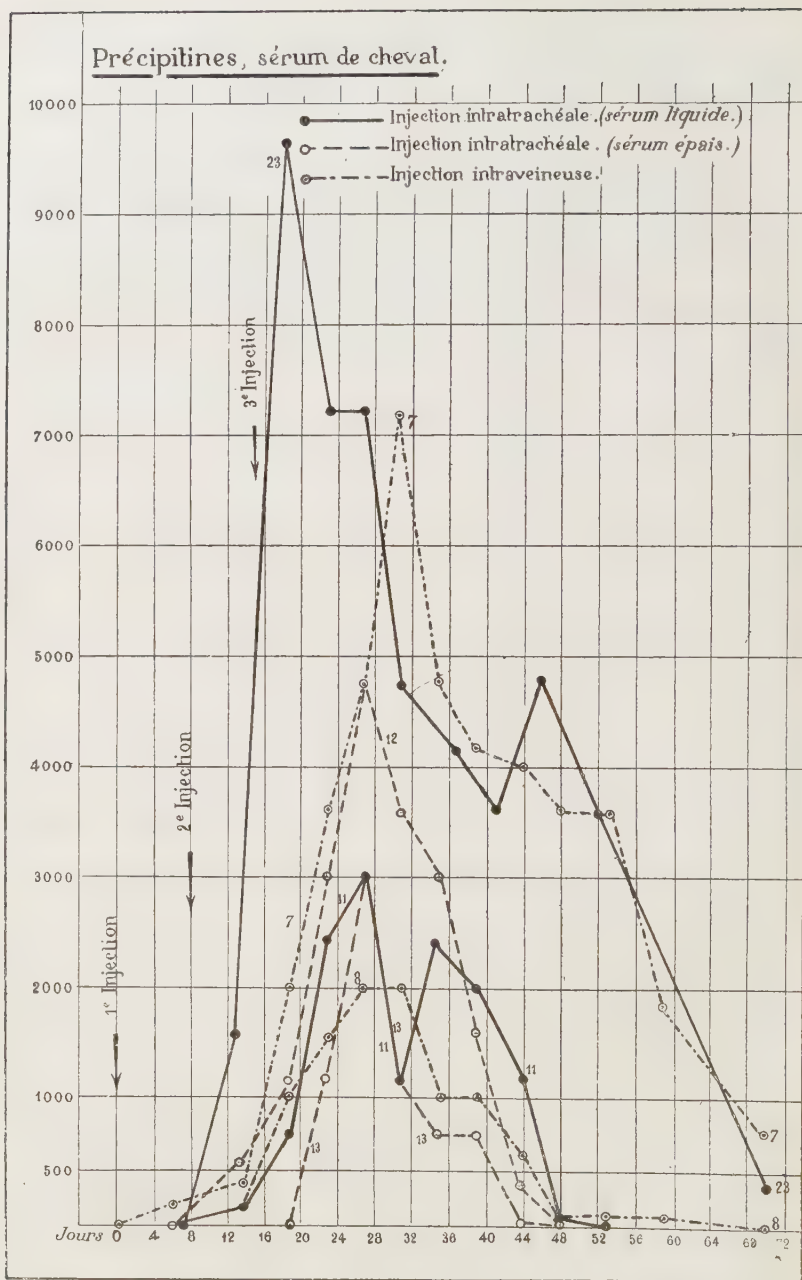


FIGURE 3.

deuxième injection, un titre de $1/600$; quatre jours après la troisième, un titre de $1/1.200$; huit jours plus tard, il atteint son maximum, soit $1/4.800$; puis en quatre jours, il retombe à $1/3.600$; trente-trois jours après la troisième injection, le pouvoir précipitant a disparu. Le poids de l'animal a augmenté pendant les premiers vingt-quatre jours ; puis, par suite d'une maladie spontanée (septicémie), il a diminué en huit jours de 300 grammes.

Chez le *lapin* n° 13, pesant 1.970 grammes, la marche de la courbe des précipitines est un peu singulière : l'apparition des précipitines est notamment fort retardée. La réaction demeure négative, non seulement six jours après la première, et sept jours après la deuxième injection, mais encore quatre jours après la dernière ; c'est seulement le huitième jour qu'elle devient manifeste à la dilution de $1/1.200$; quatre jours plus tard, le titre présente son maximum, soit $1/3.000$. Au cours de l'expérience, le poids de l'animal a augmenté de 280 grammes.

D'une façon générale, cette série d'expériences montre que, abstraction faite des écarts individuels, l'injection intratrachéale de l'antigène, pratiquée en vue d'obtenir des précipitines, produit des résultats au moins équivalents, sinon supérieurs, à ceux que donne l'injection intraveineuse.

Le titre moyen des animaux traités avec du sérum liquide par la trachée est, en effet, plus élevé que le titre fourni par les injections intraveineuses (*lapins* n°s 7 et 8).

III. — Hémolysines.

Les expériences relatives à la production des hémolysines furent faites également sur une série de quatre *lapins* : deux ont reçu les injections par la veine, deux autres par la trachée.

Le *lapin* n° 1, pesant 2.030 grammes, injecté par la veine, présente un titre de $1/50$ quatre jours après la première injection, de $1/200$ six jours après la deuxième ; six jours après la troisième, le sérum hémolyse à $1/800$; neuf jours après la dernière injection, il présente le plus haut titre, c'est-à-dire $1/1.200$; puis, il retombe en dix jours à $1/400$. Le poids de l'animal a augmenté de 100 grammes en trente et un jours.

Le *lapin* n° 2, pesant 2.045 grammes, inoculé par la veine, présente un titre de $1/50$ après la première injection et un de $1/600$ six jours après la deuxième ; l'animal meurt dans la suite. A l'autopsie, on constate au niveau de la trachée une hémorragie et des noyaux de coccidiose dans le foie.

Le *lapin* n° 3, pesant 2.150 grammes, est inoculé par la trachée ; quatre jours après, son sérum hémolyse à $1/10$; six jours après la deuxième inoculation, à $1/75$, et six jours après la troisième, à $1/400$; neuf jours après la troisième injection, la courbe des hémolysines a atteint son maximum avec $1/800$; elle retombe ensuite en dix jours à $1/100$. Le poids de l'animal, souffrant de la maladie du nez, diminue de 270 grammes en trente et un jours.

Le *lapin* n° 4, pesant 2.250 grammes, inoculé par la trachée, présente quatre jours après la première injection un titre hémolytique de 1/50; six jours après la deuxième injection, il est à 1/100; quatre jours après la troisième

TABLEAU IV. — Globules rouges de mouton.

LAPIN N°	POIDS initial	MODE d'injection des globules	1 ^{re} injection	2 ^e injection	3 ^e injection	OBSERVATIONS
1	gr. 2.030	Intravei- neux.	8-V, 3 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	13-V, 11 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	20-V, 3 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	Augmenta- tion de poids: 100 gr.
2	2.045	Intravei- neux.	8-V, 3 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	13-V, 11 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	»	Meurt le 19- 20/V. A l'au- topsie : tra- chéite, hé- morrhagie, coccidiose du foie.
3	2.150	Intra- trachéal.	8-V, 3 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	13-V, 11 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	20-V, 3 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	Perte de poids: 270 gr. (ani- mal a la ma- ladie du nez).
4	2.250	Intra- trachéal.	8-V, 3 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	13-V, 11 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	20-V, 3 h. 3 c. c. d'émulsion à 10 p. 100	Augmenta- tion de poids: 250 gr.

injection, à 1/1.600; neuf jours après la dernière injection, il atteint son maximum : 1/2.000, puis en dix jours le titre retombe rapidement à 1/200. L'animal s'est bien porté pendant la durée de l'expérience; son poids a augmenté de 250 grammes en trente et un jours.

Les courbes des hémolysines montrent que, pour la production de ces anticorps, l'administration de l'antigène par la trachée est au moins aussi favorable que l'injection intra-veineuse. Le maximum de la production est atteint le neuvième jour qui suit la troisième injection. Comme il s'agit ici d'éléments figurés et que la résorption s'effectue plus lentement que par la veine, on court moins de danger de provoquer des troubles liés à introduction d'albumine hétérogène par la voie sanguine (fig. 4).

IV. — Bactériolysines et bactéricidines.

Au point de vue spécial auquel nous nous sommes placé, il était intéressant d'examiner le pouvoir bactériolytique des sérums obtenus par la préparation intratrachéale, comparati-

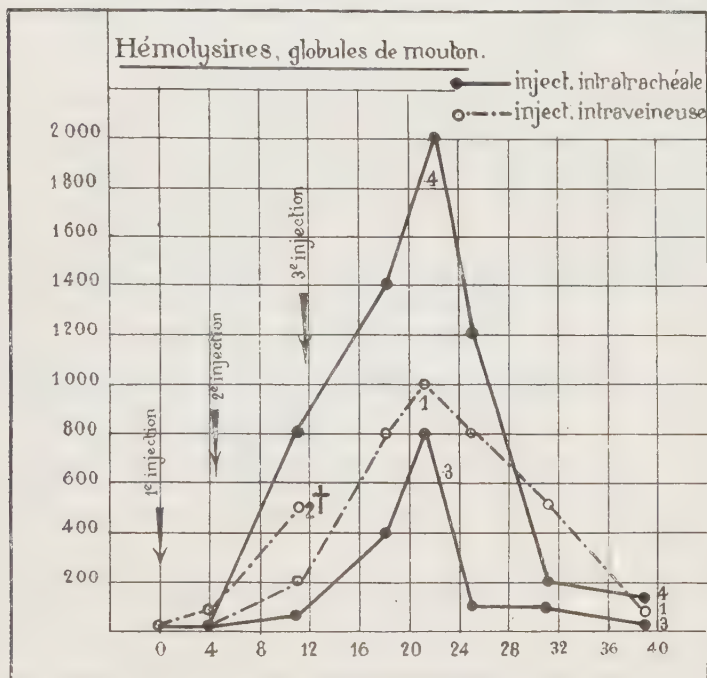


FIGURE 4.

vement avec celui des sérums obtenus par une des méthodes ordinaires.

Pour ces recherches nous avons choisi le vibron cholérique.

Quatre cobayes ont été inoculés, en trois fois, à sept jours d'intervalles, avec des vibrons morts provenant d'une culture de vingt-quatre heures; deux des animaux (les nos 45 et 46) ont été vaccinés par le péritoine, les deux autres (les nos 47 et 48) ont reçu par la trachée les mêmes doses, soit 1/20, 1/10 et 1/5 de culture morte (tableau V). Voici les résultats de l'examen, en goutte suspendue, cinq jours après la troisième injection des animaux.

Cobaye n° 45. — Au bout de vingt minutes, beaucoup d'éléments sphériques, peu mobiles, très peu de formes indemnes.

Cobaye n° 46. — Très peu de bâtonnets incurvés, la plupart immobiles et en granules peu réfringents.

Cobaye n° 47. — Granules immobiles; très peu de virgules.

Cobaye n° 48. — Beaucoup de granules; formes de virgules très rares.

Cobaye normal. — Au bout de trente minutes, formes de virgules bien nettes, douées de mouvements vifs; pas de formes dégénérées; au bout d'une heure, même constatation.

L'exsudat péritonéal fut examiné de nouveau huit jours après la troisième vaccination (tableau VI).

Afin d'augmenter encore le pouvoir bactériolytique de sérums, on inocule les cobayes de cette série, dix jours après la troisième vaccination, avec 1/20

TABLEAU V. — *Vibrien cholérique.*

LAPIN N°	POIDS initial	MODE d'injection des microbes	1 ^{re} injection	2 ^e injection	3 ^e injection	OBSERVATIONS
45	gr. 540	Intrapéritonéal.	17-VI, 5 h. 1/10 de culture morte (1 h. à 60°).	24-VI, 11 h. 1/10 de culture morte (1 h. à 60°).	30-VI, 3 h. 1/5 de culture morte (1 h. à 60°).	10-VII, 3 h. 1/20 de culture vivante
46	400	Intrapéritonéal.	17-VI, 5 h. 1/20 de culture morte	24-VI, 11 h. 1/10 de culture morte	30-VI, 3 h. 1/5 de culture morte	10-VII, 3 h. 1/20 de culture vivante
47	500	Intratrachéal.	17-VI, 5 h. 1/20 de culture morte	24-VI, 11 h. 1/10 de culture morte	30-VI, 3 h. 1/5 de culture morte	10-VII, 3 h. 1/20 de culture vivante
48	450	Intratrachéal.	17-VI, 3 h. 1/20 de culture morte	24-VI, 11 h. 1/10 de culture morte	30-VI, 3 h. 1/5 de culture morte	10-VII, 3 h. 1/20 de culture vivante

d'une culture vivante; neuf jours après, on examine de nouveau l'exsudat péritonéal. Les résultats obtenus correspondent à ceux enregistrés ci-dessus. Nous nous bornons à donner le procès-verbal du dernier examen, pratiqué douze jours après l'inoculation.

(Dans l'expérience avec le sérum n° 47, on observe que, aux dilutions de 1/10 et 1/20, le pouvoir bactéricide est moins considérable qu'aux concentrations moins grandes. Ce phénomène, décrit pour la première fois par Neisser et Wechsberg, est dû, d'après ces auteurs, à la déviation du complément déterminée par l'excès de sensibilisatrice [tableau IX]).

Le dosage du pouvoir bactéricide confirme les résultats constatés antérieurement. De plus, l'expérience montre que le sérum du cobaye n° 47 préparé par la trachée est, au point de vue du pouvoir bactéricide, 4 à 5 fois supérieur au sérum de l'animal injecté par le péritoine.

TABLEAU VI.

NUMÉRO du cobaye	GOUTTE SUSPENDUE	PRÉPARATION COLORÉE au bout d'une heure	CULTURE au bout de 3 heures
45	Au bout de 20 minutes, très peu de mobiles; pas de formes indemnes; après 3 heures, pas de formes mobiles.	Formes de virgules très rares; granules.	Environ 100.000.
46	Au bout de 20 minutes, aucun mouvement; granules nombreux, peu réfringents.	Éléments nombreux, ressemblant à des microcoques mal colorés, pâles.	Colonies isolées seulement.
47	Au bout de 20 minutes, aucun mouvement; granules très nombreux.	Granules mal colorés.	200.000 colonies.
48	Au bout de 20 minutes aucun mouvement; granules peu réfringents.	Formes de virgules très rares; débris irréguliers, mal colorés.	Environ 1.000.000 de colonies.
Cobaye normal	Au bout de 1 heure beaucoup de vibrions mobiles, d'aspect normal; même au bout de 3 heures, les vibrions ont gardé leurs formes de virgules et les mouvements oscillatoires.	Dans chaque champ visuel, plusieurs virgules colorés en rouge foncé.	Colonies ∞ .

TABLEAU VII.

NUMÉRO du cobaye	GOUTTE SUSPENDUE	PRÉPARATION COLORÉE au bout d'une heure	CULTURE au bout de 3 heures
45	Granules arrondis, ternes, pas de formes bien définies.	Virgules en granules mal colorés; formes ressemblant à des bacilles diphtériques.	Le milieu est resté stérile.
46	Granules immobiles, pas de formes de virgule.	Granules arrondis pâles.	Id.
47	Point de mouvement; granules ternes, peu réfringents.	Pas de vibrions intacts; granules rouge clair.	Id.
48	Très peu de mouvement, beaucoup de granules.	Pas de vibrions indemnes, granules pâles.	Environ 100.000 colonies.
Cobaye normal	Peu de vibrions, mais bien mobiles, mouvement et aspect caractéristiques.	Beaucoup de vibrions en forme de virgules rouge foncé	Colonies ∞ .

TABLEAU VIII. — Sérum du cobaye n° 46 (injecté par le péritoine).

ÉPROU- VETTE N°		COULÉ en boîtes de Petri après heures	NOMBRE de colonies au bout de 24 h.
1	0,2 émuls. chol. + 0,2 alex. + 0,5 sér. 1/2	3	0
2	— — 0,5 sér. 1/10	3	0
3	— — 0,5 sér. 1/20	3	0
4	— — 0,5 sér. 1/50	3	0
5	— — 0,5 sér. 1/100	3	750
6	— — 0,5 sér. 1/200	3	∞
7	— — 0,5 sér. 1/500	3	∞
8	— — 0,5 sér. 1/5000	3	∞

TABLEAU IX. — Sérum du cobaye n° 47 (injecté par la trachée).

ÉPROU- VETTE N°		COULÉ en boîtes de Petri après heures	NOMBRE de colonies au bout de 24 h.
1	0,2 émuls. chol. + 0,2 alex. + 0,5 sér. 1/2	3	0
2	— — 0,5 sér. 1/10	3	300
3	— — 0,5 sér. 1/20	3	très peu.
4	— — 0,5 sér. 1/50	3	0
5	— — 0,5 sér. 1/100	3	0
6	— — 0,5 sér. 1/200	3	env. 70
7	— — 0,5 sér. 1/500	3	env. 1.500
8	— — 0,5 sér. 1/1000	3	∞
9	— — 0,5 sér. 1/5000	3	∞

TABLEAU X. — Sérum du cobaye témoin.

ÉPROU- VETTE N°		COULÉ en boîtes de Petri après heures	NOMBRE de colonies au bout de 20 h.
I	0,2 émuls. chol. + 0,7 Cl Na	tout de suite	env. 4.500
II	— + 0,7 Cl Na	3	∞
III	— + 0,2 alex. + 0,5 sér. 1/2	3	∞
IV	— — + 0,5 sér. 1/10	3	∞
V	— — + 0,5 sér. 1/50	3	∞

B. — L'IMMUNITÉ GÉNÉRALE

I. — L'immunité active.

Pour se rendre compte de la valeur d'une méthode de vaccination, il n'est tel que mettre les animaux vaccinés à l'épreuve d'une dose ou plusieurs doses mortelles. C'est de cette façon qu'il a été procédé dans les expériences que nous allons décrire.

Dans la première série, nous avons pris les lapins n^{os} 84 et 99, immunisés contre le virus paratyphique B et qui ont déjà servi dans notre expérience sur les agglutinines.

Le *lapin* n^o 84 reçoit en trois fois, à intervalles de 7 jours, des bacilles paratyphiques (1/20 de culture vivante; 1/20 de culture morte, 1/10 de culture vivante) par la voie trachéale. Vingt-neuf jours après la dernière inoculation, le lapin présente un titre agglutinant de 1/6.000; il reçoit par la veine 1/5 de culture vivante paratyphique de vingt heures, ce qui correspond à une dose trois fois mortelle. L'animal succombe 30 heures après. L'autopsie révèle un œdème pulmonaire, une trachéite hémorragique et une légère tuméfaction de la rate. La vaccination n'était donc pas suffisante pour conférer à l'animal une immunité vis-à-vis d'une dose trois fois mortelle.

Le *lapin* n^o 99, vacciné comme le n^o 84, reçoit, trente jours après la troisième inoculation, une injection intratrachéale de 1/5 de culture paratyphique. Douze jours après la quatrième, l'animal, dont le sérum agglutine à 1/20.000, est mis à l'épreuve; il reçoit par la veine 1/5 de culture vivante. Il résiste à cette dose et se rétablit.

Dans une autre série d'expériences, nous nous sommes adressé à des cobayes. Nous avons préalablement établi que la dose minima mortelle est inférieure à 1/100 de culture en injection intrapéritonéale.

Deux *cobayes* n^{os} 14 et 33 furent vaccinés trois fois, l'un par le péritoine l'autre par la trachée; dix-sept jours après la dernière injection, tous deux furent soumis à l'épreuve.

Le tableau suivant indique les dates des injections :

TABLEAU XI.

COBAYE N ^o	INJECTÉ par la voie	POIDS initial	1 ^{re} injection	2 ^e injection	3 ^e injection	SOUMIS à l'épreuve
14	Périto- néale.	gr. 485	6-VII, 1/40 de culture morte.	13-VII, 1/100 de culture vivante.	30-VII, 1/40 de culture vivante.	6-VIII, 1/20 de culture vivante dans le péritoine.
33	Trachéale.	400				

La dose de 1/20 de culture, qui dépasse au moins de cinq fois la dose minima mortelle, fut bien supportée par les deux animaux et surtout par le cobaye n° 33, vacciné par la trachée. Pour mieux illustrer l'influence de la vaccination par les différentes voies sur l'état général des animaux et sur la solidité de l'immunité acquise, nous indiquons ci-dessous graphiquement les variations de leurs poids :

Il ressort de ces expériences que, chez l'animal traité par le péritoine, le poids subit une perte assez considérable après la

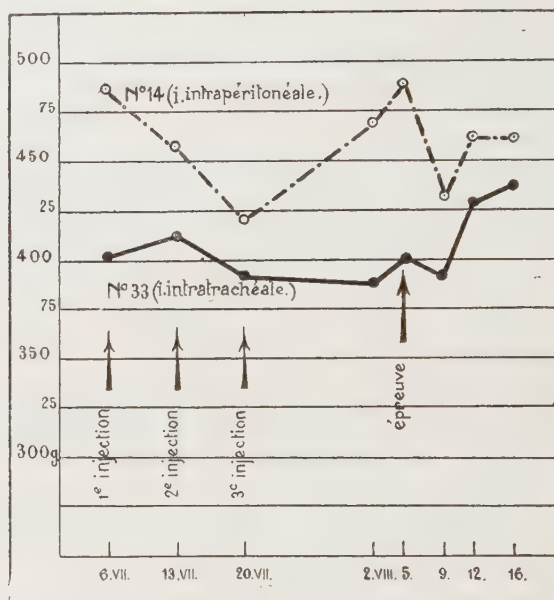


FIGURE 5.

première et la deuxième injection, alors que chez le cobaye vacciné par la trachée, le poids ne subit que des oscillations à peine marquées. L'immunité, conférée au cobaye n° 33 par la voie trachéale, était donc plus solide que celle produite chez le cobaye n° 14 par la voie péritonéale.

Cette différence a été au moins aussi manifeste dans l'expérience suivante. Trois cobayes ont reçu, à quatre reprises, des bacilles paratyphiques, deux par la voie péritonéale, le troisième par la trachée. Quinze jours après la dernière injection, on soumet à l'épreuve le cobaye vacciné par le péritoine (1/20 de culture vivante). Il supporte cette dose. Les deux autres ani-

maux reçoivent, vingt jours après la quatrième vaccination, 1/15 de culture paratyphique B.

Les détails des expériences sont consignés dans le tableau suivant :

TABLEAU XII.

COBAYE N°	POIDS initial	INJECTÉ par la voie	1 ^{re} injection	2 ^e injection	3 ^e injection	4 ^e injection	SOU MIS à l'épreuve
76	gr. 500	Périto- néale.	20-VI, 1/100 de culture morte.	6-VII, 1/20 de culture morte.	13-VII, 1/100 de culture vivante.	20-VII, 1/40 de culture vivante	4-VIII, 1/20 de culture vivante.
77	350	Périto- néale.					9-VIII, 1/15 de culture vivante
80	420	Trachéale.					par la voie périto- néale.

Le *cobaye* n° 76 tolère bien la dose de 1/20 de culture; mais la vaccination ultérieure est suivie d'une perte de poids considérable, perte qui s'accroît surtout après l'injection de la dose cinq fois mortelle.

Le *cobaye* n° 77 perd du poids au cours de la vaccination, surtout après la troisième injection; puis, ayant rattrapé son poids initial avant d'être soumis à l'épreuve, il perd de nouveau 20 grammes. Il paraît assez solidement vacciné contre la dose environ 8 fois mortelle.

Le *cobaye* n° 80, vacciné par la trachée, jouit pendant toute la durée de la vaccination d'une santé parfaite et d'un excellent état apparent, ainsi que le montre la courbe relative à son poids; ce n'est qu'après la troisième injection, à la première administration de bacilles vivants, qu'on remarque un léger abaissement de la courbe, qui, d'ailleurs, est de courte durée; dès la quatrième inoculation, le poids augmente assez rapidement, sans interruption, et même l'injection d'une dose 8 fois mortelle ne peut troubler l'ascension qui est plus rapide encore qu'avant l'épreuve.

L'immunité conférée par la voie aérienne a donc été très solide.

Pour déterminer la valeur de l'injection intratrachéale dans l'immunité active, nous avons eu recours à un autre germe, au vibrion cholérique. Nous avons utilisé les cobayes dont nous nous étions servis pour obtenir le sérum bactériolytique.

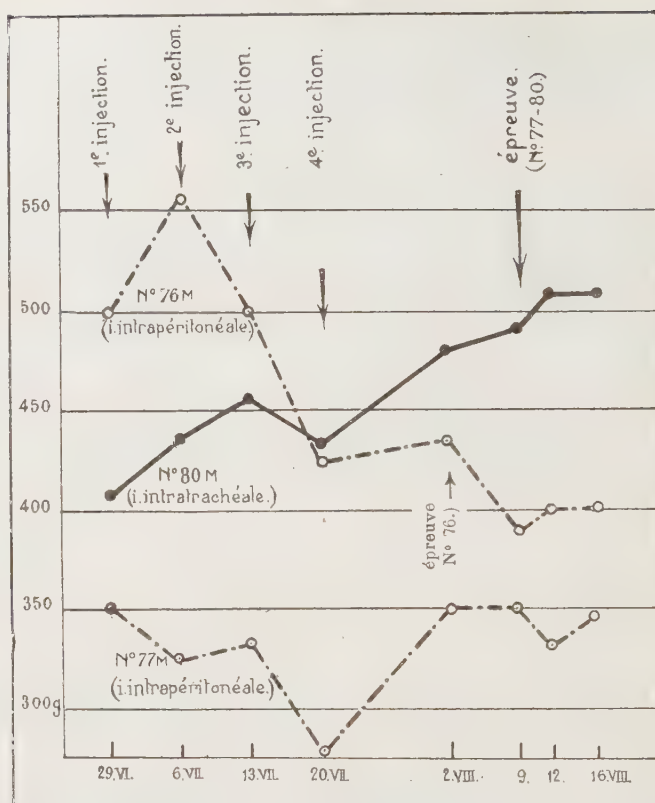


FIGURE 6.

Nous rappelons ci-dessous la préparation des animaux :

TABLEAU XIII.

COBAYE N°	POIDS initial	INJECTÉ par la voie	1 ^{re} injection	2 ^e injection	3 ^e injection	4 ^e injection	SOU MIS à l'épreuve
45	gr. 540	Périto- néale.	17-VI, 1/20 de culture	24-VI, 1/10 de culture morte.	30-VI, 1/5 de culture morte.	10-VII, 1/20 de culture vivante.	4-VII, 1/20 de culture vivante.
46	400	Périto- néale.	de vibron choléri- que mort.				6-VIII, 1/20 de culture vivante
47	500	Trachéale.	1 h. à 60°.				par voie périto- néale.

Il a été déterminé au préalable la virulence de notre culture de vibrions :

Le *cobaye* n° 20, pesant 350 grammes, reçoit, en injection péritonéale, 1/40 de culture sur gélose ; il succombe huit heures après.

Le *cobaye* n° 21, pesant 285 grammes, reçoit, en injection péritonéale, 1/100 de culture vivante ; il présente quelque malaise, mais se rétablit vite.

D'après ces expériences, la dose minima mortelle pour les cobayes est de 1/60 de culture vivante.

Le *cobaye* n° 45 reçoit, en injection péritonéale, vingt-quatre jours après la dernière inoculation, 1/20 de culture, soit une dose trois fois mortelle ; il supporte cette dose, non sans accuser une perte de poids considérable. Les deux autres cobayes, n°s 46 et 47, également soumis à l'épreuve, reçoivent la même dose de 1/20 de culture ; tous deux ont survécu.

Comme nous l'avons déjà vu pour le virus paratyphique, l'immunité de l'animal préparé par la trachée vis-à-vis du vibron cholérique paraît donc au moins aussi solide que celle des cobayes préparés par la voie péritonéale.

II. — L'immunité passive.

Il a été démontré ailleurs (1) que la voie respiratoire se prête aisément à la transmission de l'immunité passive. Pour le vérifier de nouveau, nous avons eu recours aux sérums des cobayes n°s 46 et 47.

L'expérience se trouve résumée dans le tableau suivant :

TABLEAU XIV.

COBAYE N°	POIDS	INJECTÉ par la voie	SÉRUM anticholérique	INJECTION intrapéritonéale	OBSERVATIONS
I	255 gr.	Péritonéale.	12/VII, 4 h. 0 c. c. 3 du cobaye 46.	13/VIII, 10 h.	Mort 8 h. après. Autopsie : vais- seaux du péri- toine injectés, épanchements.
II	190 gr.	Trachéale.	0 c. c. 3 du cobaye 46.	1/60 de cul- ture choléri- que vivante.	Survit. Poids augmenté le 16/VIII.
III	240 gr.	Péritonéale.	0 c. c. 3 du cobaye 47.	"	Survit. Poids augmenté le 16-VIII.
IV	220 gr.	Trachéale.	0 c. c. 3 du cobaye 47.	"	Survit. Poids augmenté le 11/VIII.

(1) BESREDKA. *Loc. cit.*

Il résulte de cette expérience que la valeur thérapeutique du sérum n° 47, préparé par la trachée, est supérieure à celle du sérum obtenu par la préparation intrapéritonéale, ce qui concorde avec le résultat de l'expérience sur le pouvoir bactéricide. De plus, il semble que l'administration intratrachéale du sérum est plus efficace que l'administration intrapéritonéale.

RÉSUMÉ

Au cours de ces expériences nous avons constaté les faits suivants :

1° Des lapins, immunisés par la voie aérienne avec des doses croissantes de virus paratyphique B, produisent des agglutinines en abondance. Au point de vue du moment d'apparition, de la quantité et du moment de disparition de ces anticorps, ces animaux ne le cèdent en rien à ceux préparés avec les mêmes doses par la voie sanguine. De plus, les virus sont bien mieux tolérés par la voie respiratoire, la dose mortelle du bacille paratyphique B étant par la voie aérienne environ dix fois supérieure à celle par la voie veineuse.

Le bacille de l'avortement contagieux du bétail (bacille de Bang), germe très peu offensif, administré à des lapins par la voie aérienne, produit des agglutinines en bien moindre quantité qu'en injection intraveineuse; par des injections répétées dans la trachée, on peut, d'ailleurs, arriver à produire à peu près la même quantité d'anticorps.

2° Au point de vue de la quantité et de la persistance des précipitines vis-à-vis du sérum de cheval, le lapin se comporte de même que l'injection soit faite par la voie trachéale ou par la voie veineuse. Au point de vue de la rapidité de leur apparition et l'intensité de la réaction, l'injection intratrachéale ne le cède en rien à l'injection intraveineuse; elle paraît même supérieure à cette dernière.

3° La voie respiratoire se prête également à la production d'hémolysines; les mêmes doses d'antigène, qu'elles soient injectées par la trachée ou par la veine, produisent ces anticorps au moins aussi rapidement et aussi abondamment.

4° Les bactériolysines et bactéricidines contre le vibron cholérique sont produites, chez le cobaye, plus facilement, c'est-à-dire en quantité plus grande par injection intratrachéale que par injection péritonéale. Le sérum anticholérique produit par l'injection intratrachéale est plus actif, quant à son pouvoir bactéricide et préventif, que celui fourni par l'injection intrapéritonéale.

5° Au moyen d'une injection intratrachéale de virus paratyphique B, il est possible de conférer à des lapins une immunité active leur permettant de résister à une dose trois fois mortelle.

Des recherches comparatives sur l'immunité acquise par les voies respiratoire et péritonéale, chez des cobayes, montrent que l'injection intratrachéale crée une immunité plus solide contre le virus paratyphique B, que l'injection intrapéritonéale; de plus, les injections intratrachéales sont mieux tolérées.

Des recherches comparatives sur des cobayes immunisés contre le vibron cholérique ont donné le même résultat.

6° Le pouvoir protecteur du sérum anticholérique s'est montré supérieur en injection intratrachéale, qu'en injection péritonéale.

..

Quelles sont les conclusions pratiques qui se dégagent de nos expériences?

Pour obtenir des sérums agglutinants, on aura avantage à recourir à l'immunisation intratrachéale, surtout dans les cas des germes virulents, tels que bacilles du groupe typhique ou dysentérique.

Par la voie trachéale on pourra très facilement obtenir des sérums précipitants que l'on utilise en médecine légale pour différencier les albumines; on pourra par le même procédé préparer des sérums hémolytiques et des sérums fortement bactéricides.

Il y aura lieu de rechercher si, en administrant aux grands animaux fournisseurs de sérums des vibrions cholériques par la trachée, il ne serait pas possible de produire un sérum anticholérique plus actif que celui qu'on obtient par les méthodes ordinaires. Nous rappelons ici le pouvoir de résorp-

tion à peu près illimité de la muqueuse respiratoire du cheval et la simplicité de la technique de l'injection.

Il y aura lieu de voir si cette méthode d'administration est susceptible de produire, d'une façon générale, des sérums actifs contre les microbes pathogènes (virus de la peste bubonique, méningocoques, bacilles du rouget du porc, bacilles du charbon, etc.).

La vaccination intratrachéale est indiquée en cas de microbes (streptocoques, bacilles du rouget de porc, bacille de la peste) qui au cours de l'immunisation provoquent chez les animaux producteurs du sérum des troubles locaux, par exemple, des arthrites. Il est possible que le procédé des injections intratrachéales nous ouvre encore des perspectives en ce qui concerne l'immunisation active dans la tuberculose des bovidés. Les résultats obtenus au cours de nos recherches sur l'immunité active, joints à ceux que Besredka a obtenus dans la tuberculose expérimentale du lapin, semblent justifier cet espoir.

Enfin, dans bien des maladies contagieuses, l'administration de sérums pourra être tentée par la voie respiratoire.

Nous sommes heureux d'exprimer ici à M. le professeur Besredka, qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire, nos bien sincères remerciements aussi bien pour le sujet du présent travail que pour l'intérêt qu'il nous a toujours témoigné.

RECHERCHES BACTÉRIOLOGIQUES

EXÉCUTÉES AU SUJET D'UNE ÉPIZOOTIE PORCINE

par le Dr R. BRUYNOGHE, professeur à l'Université de Louvain
et E. LEYNEN, inspecteur-vétérinaire à Louvain.

Depuis que l'élevage du porc s'est intensifié, on a observé dans tout le pays, et à ce qu'il paraît d'une façon spéciale dans les environs de Louvain, des épizooties causant de réels ravages.

Le ministère de l'Agriculture nous a chargé d'étudier ces épizooties au point de vue bactériologique, et c'est le résultat de ces recherches que nous avons l'avantage d'exposer brièvement.

Nous avons reçu pour l'analyse, en tout vingt produits provenant d'animaux morts ou malades ; nous y avons trouvé :

6 fois le bacille du rouget ;

7 fois un bacille paratyphique ;

1 fois un bacille pathogène non identifié et

6 fois des microbes banaux, tels que le staphylocoque, le colibacille, le *Bacillus fluorescens*, *liquefaciens*, etc.

Ces germes saprophytes ont été isolés pour la plupart d'échantillons de sang prélevé au lobe de l'oreille de l'animal en vie, et il est possible que, dans ces conditions, quelquefois l'agent pathogène ait échappé à nos investigations, à cause de la surabondance des microbes de contamination.

Dans les organes remis pour l'analyse sans trop de retard, le germe pathogène existait généralement en culture pure et il a été isolé tantôt par culture sur gélose, tantôt par inoculation d'animaux de laboratoire.

Afin de simplifier notre exposé, nous diviserons notre rapport en trois chapitres distincts où nous traiterons séparément les recherches relatives au rouget, celles se rapportant au bacille paratyphique et celles concernant le bacille non identifié ; enfin nous envisagerons sommairement la question de la vaccination préventive.

CHAPITRE I

ROUGET

Dans tous ces cas, le bacille en question a été isolé des organes de porcs morts ou abattus (rate, foie, poumon) par culture en strie sur gélose inclinée. Le développement caractéristique ainsi obtenu a été identifié par l'examen microscopique, par la culture du microbe sur les divers milieux et par l'inoculation de souris et de cobayes. Toutes nos souches isolées étaient inoffensives pour les cobayes et pathogènes pour les souris. D'après leur virulence, elles tuaient ces dernières en deux à cinq jours.

Nous n'allons pas nous étendre davantage sur les caractères de ces germes; ceux-ci sont exactement décrits dans tous les traités classiques.

Une question qui, à notre connaissance, n'était pas résolue, c'était celle relative à l'unité ou à la pluralité des souches de rouget.

Etant en possession d'un assez grand nombre de celles-ci, nous avons cherché à élucider ce problème. En effet, s'il est prouvé qu'il peut exister des souches différentes de rouget, il importe d'en préciser le nombre afin que toutes soient utilisées pour la vaccination préventive et pour la préparation du sérum spécifique. Ces recherches nous semblaient d'autant plus indiquées que, d'après certaines observations, des cas de rouget avaient été constatés chez des animaux qui avaient subi la vaccination.

Pour résoudre le problème envisagé, nous avons examiné les propriétés fermentatives et biologiques de nos diverses cultures. Ces recherches ont en réalité pu porter sur onze cultures différentes dont ci-après la provenance :

- a) Six avaient été isolées par nous;
- b) Deux provenaient de notre collection de microbes et
- c) trois (les souches Pasteur, Petit et Colon) nous avaient été remises par l'Institut Pasteur de Paris. Nous en profitons ici pour exprimer à M. le professeur Calmette tous nos remerciements pour cette obligeance.

Nous avons examiné l'activité fermentative de nos cultures pour les sucres suivants : le glucose, le lactose, le saccharose, le maltose et la mannite. Nous avons utilisé à cet effet un milieu de culture préparé d'après la formule de Barsiekow dont ci-dessous la composition :

1 gr. de sucre,
1 gr. de peptone,
1 gr. de nutrose,
1/2 gr. de sel de cuisine,
100 gr. d'eau et 5 cent. cubes de teinture de tournesol.

Toutes nos souches attaquaient faiblement, sans production de gaz, le glucose et le lactose et faisaient de ce fait virer un peu ces milieux au rouge. Dans les autres sucres, il ne se produisait aucune fermentation, sauf que la souche Pasteur nous a semblé modifier un peu la coloration du milieu maltosé.

Pour étudier les propriétés biologiques ou sérologiques de nos souches, nous avons préparé des sérums monovalents dont nous avons examiné l'activité vis-à-vis de nos diverses cultures.

Nous avons employé pour la préparation de ces sérums des cobayes et des lapins.

Les premiers ont été injectés trois fois, à huit jours d'intervalle, avec des cultures vivantes (4 cent. cubes d'une culture en bouillon ordinaire âgée de quarante-huit heures). Ces sérums étaient pour ainsi dire totalement inactifs et de chef impropres aux recherches envisagées.

Par contre, un lapin inoculé trois fois, à trois ou quatre jours d'intervalle, avec une culture tuée de rouget Petit (culture en bouillon ordinaire) nous a fourni un sérum bien actif dont nous avons déterminé la teneur en substances sensibilisatrices et en agglutinines pour nos diverses souches.

Enfin, dans un essai nous avons examiné la valeur préventive de ce sérum contre l'infection expérimentale.

Ci-dessous le résultat de ces recherches :

1° DOSAGE DES SUBSTANCES SENSIBILISATRICES.

Pour faire ce dosage nous mettons dans une série de tubes :

a) Une dose constante de culture de rouget en bouillon,
0,25 cent. cubes ;

b) Des doses décroissantes du sérum antirouget Petit chauffé à 56° durant une demi-heure ;

c) Un vingtième de centimètre cube d'alexine.

Après une heure de séjour à l'étuve, nous ajoutons au contenu de ces tubes le système hémolytique, soit 1 centimètre de globules dilués à 1 sur 20 dans de l'eau physiologique et chargés d'une dose d'hémolysine représentant sensiblement cinq fois le titre de celle-ci.

Comme contrôles, nous avons les essais suivants :

a) Double dose de culture rouget + 1/20 cent. cube d'alexine ;

b) Double dose de sérum + 1/20 cent. cube d'alexine ;

c) 0,25 cent. cube de bouillon ordinaire + doses décroissantes de sérum antirouget + 1/20 cent. cube alexine.

CULTURES	DOSES DE SÉRUM ANTI ROUGET (PETIT)				
	0,1	1/50	1/200	1/400	1/800
R. Petit	++ (1)	++	F. +	— (2)	—
R. Pasteur.	++	++	+	—	—
R. Colon.	++	++	+	—	—
R. I.	++	++	+	—	—
R. II.	++	++	F. +	—	—
R. III.	++	++	+	—	—
R. Mis.	++	++	+	—	—
R. Vau.	++	++	+	—	—
R. Est.	++	++	+	—	—
R. Mahio.	++	++	+	—	—
R. Want.	++	++	+	—	—
Bouillon ordinaire. .	++	—	—	—	—

(1) ++ indique la déviation de l'alexine et l'absence d'hémolyse.
 (2) — signifie l'inverse.

Ainsi qu'il résulte d'une façon évidente de l'examen de ce tableau, notre sérum antirouget monovalent (Petit) dévie l'alexine avec la même intensité quelle que soit la souche employée comme antigène. Les légères différences notées ne doivent être attribuées à la provenance de la culture, mais au développement plus ou moins abondant de nos diverses souches, ce qui entraîne évidemment de petites différences dans les doses

d'antigène utilisées. D'ailleurs dans d'autres essais, nous avons observé des variations analogues, mais cette fois pour des cultures qui avaient dévié dans la recherche précédente le mieux l'alexine.

2° DOSAGE DES AGGLUTININES.

Pour ces essais, nous avons utilisé des cultures en bouillon additionné de liquide d'ascite. Dans ce milieu, le développement était assez abondant pour avoir une émulsion suffisamment dense pour les recherches en question :

CULTURES	DOSES DÉCROISSANTES SÉRUM ANTI ROUGET (PETIT)				
	1/10	1/50	1/100	1/200	Contrôle
R. Petit	++	++	+	—	—
R. Pasteur.	++	++	F. +	—	—
R. Colon.	++	++	F. +	—	—
R. 3	++	++	F. +	—	—
R. 4	++	++	+	—	—
R. 5	++	++	F. +	—	—
R. Est.	++	+	+	—	—
R. Waut.	++	++	F. +	—	—
R. Mahio.	+	+	F. +	—	—

Notre sérum n'était pas très agglutinant et la réaction ne se produisait que lentement (au bout de quatre à cinq heures d'étuve). Malgré cela, l'agglutination était bien spécifique et elle faisait complètement défaut dans les essais exécutés avec du sérum ordinaire ou avec un sérum agglutinant pour un autre microbe (par exemple, sérum antiparatyphique).

De ces recherches ainsi que de celles relatives à la déviation de l'alexine, il résulte qu'un sérum antirouget monovalent exerce la même influence sur les diverses cultures de rouget et qu'il n'y a donc pas lieu, comme pour d'autres microbes pathogènes, d'admettre l'existence de races biologiques distinctes les unes des autres.

Nous sommes arrivés au même résultat en inoculant des souris avec ce sérum et des cultures. La valeur préventive de la sérothérapie dépendait exclusivement de la virulence de la

souche inoculée. Ainsi les souris injectées avec la culture « rouget Petit » sont mortes malgré l'administration de 2/10 de cent. cube de sérum antirouget « Petit », alors que celles injectées avec une souche de rouget moins virulente sont restées en vie grâce à cette sérothérapie.

CHAPITRE II

BACILLE PARATYPHIQUE

En 1917 et 1918, l'un (1) de nous avait isolé des organes de porcs morts, ou d'animaux abattus parce qu'ils toussaient et dépérissaient, un bacille paratyphique spécial qu'il avait sommairement décrit dans une communication faite à la Société belge de biologie.

Au cours de nos recherches actuelles, nous avons isolé de nouveau à diverses reprises ce même microbe dont nous avons cherché, par de nouvelles investigations, à déterminer mieux l'identité et l'action pathogène.

Une première question qu'il fallait résoudre, c'était d'établir si le germe isolé était un simple surinfectant de la peste porcine analogue ou identique au bacille suïpestifer, ou s'il était l'agent causal d'une maladie distincte.

Nos recherches et observations plaident pour la seconde thèse, étant donné :

1° Que les porcs autopsiés ne présentaient des lésions évidentes qu'au niveau de l'appareil respiratoire (broncho-pneumonie, œdème et infarctus pulmonaires) surtout dans la partie antérieure du lobe supérieur et médian et que les lésions intestinales, qui sont généralement fort étendues dans la peste porcine, faisaient complètement défaut ;

2° Que les vaccinations pratiquées avec des cultures tuées des microbes en question ont réussi à enrayer l'épizootie dans des porcheries infestées. Il est évident que si on avait eu affaire à la véritable peste porcine, les injections de ce vaccin n'auraient pas pu influencer la marche de l'épizootie ;

3° Que nous avons inoculé à deux reprises des porcelets avec

(1) BRUYNOGHE. *C. R. de la Soc. belge de Biol.*, 23 juin 1919.

le filtrat d'organes de porcs morts de cette infection paratyphique sans produire ainsi la peste. Pour ces inoculations, nous avons utilisé dans un essai le filtrat d'une rate et dans un autre celui du poumon.

Ajoutons à cela que d'autres auteurs (Glässer (1), Dammann et Stedefeder (2), etc.) ont décrit également des épizooties porcines d'origine paratyphique. D'après Cominotti (3), ces affections paratyphiques ne seraient transmissibles que pour autant qu'elles seraient produites par la souche paratyphique « Voldagsen », l'inoculation du bacille suiptestifer donnant naissance, d'après cet auteur, à une affection non contagieuse.

Quant au rapport existant entre nos diverses souches, nos recherches établissent qu'elles sont toutes agglutinées au même titre par des sérums monovalents. L'un de ceux-ci a été préparé en 1918 en injectant au lapin des cultures tuées de la souche Wil., l'autre en 1920 en utilisant comme vaccin la culture Frat. Ces essais d'agglutination ont porté, si nous y joignons ceux pratiqués en 1918, sur dix-sept souches (cultures provenant de porcs différents).

Nous donnons ci-dessous le résultat de l'agglutination de quelques souches récemment isolées.

CULTURES	SÉRUM ANTI-WIL.						
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1.600	1/3.200	Contrôle
Mar.	+++	++	++	++	—	+	—
Dim.	+++	+++	+++	++	+	+	—
Gr. R.	+++	+++	+++	+	+	?	—
Waut.	+++	+++	++	++	+	+	—
Frat.	+++	+++	++	++	+	?	—

Etant donnés ces résultats, il est évident que toutes ces cultures forment une seule et même variété.

Reste à élucider maintenant le rapport existant entre ce microbe et le bacille suiptestifer.

(1) GLASSER. *Deut. tierärztl. Wochenschr.*, 1907.

(2) DAMMANN et STEDEFER. *Arch. f. Wiss. und prakt. Tierh.*, 1910

(3) COMINOTTI. *Clinica veterinaria*, 1919.

Les recherches instituées pour résoudre cette question ont établi : 1° Que le sérum antisuipestifer actif 1 : 800, préparé en inoculant au lapin une culture tuée d'une souche de suipestifer reçue de l'Institut Pasteur de Paris, n'agglutinait aucune de nos cultures paratyphiques isolées du porc. Cette absence d'agglutination a été constatée aussi bien avec des cultures fraîchement isolées qu'avec des cultures repiquées régulièrement depuis plusieurs mois ;

2° Que nos deux cultures de suipestifer (l'une provenant de notre collection, l'autre de la collection de l'Institut Pasteur) n'étaient pas agglutinées, pas même à 1 : 25, par nos deux sérums antiparatyphiques (anti-Wil. et anti-Frat.).

Nous ne voulons pas prétendre pour cela qu'il y a lieu de différencier complètement notre bacille paratyphique du *Bacillus suipestifer*, étant donné que d'autres auteurs, entre autres Gildemeister et Haendel (1), ont isolé également de semblables germes dont quelques-uns, dans la suite, ont pu être identifiés au point de vue sérologique avec le *Bacillus suipestifer*.

Nous faisons toutefois remarquer que nos deux souches authentiques de suipestifer montrent au point de vue de l'agglutination, une parenté nette avec les microbes du groupe du *Bacillus Gärtner*, alors que nos cultures paratyphiques du porc ne sont pas influencées par ce sérum et se comportent comme si elles formaient plutôt un groupe sérologique distinct de l'*Enterides* et du paratyphus B.

Pour ne pas allonger démesurément notre exposé, nous n'allons pas donner ici le résultat de tous nos essais d'agglutination ; nous nous contenterons de faire remarquer que la parenté entre le *Bacillus suipestifer*, le *Bacillus enteritidis* Gärtner, le bacille du typhus des souris et des rats est telle qu'il n'est pas possible de différencier sérologiquement ces diverses cultures les unes des autres, alors que ces différents sérums (antisuipestifer, antienterides et antityphus souris) sont sans action sur nos cultures paratyphiques isolées du porc.

Nous avons examiné le pouvoir fermentatif de quelques-unes des souches isolées au cours des analyses exécutées en 1919 et 1920.

(1) HENDEL et GILDEMEISTER. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1911.

Nous avons utilisé à cet effet le milieu de Barsiekow préparé avec les divers sucres, comme il a été indiqué plus haut.

Ci-dessous le résultat de ces essais :

CULTURES	GLUCOSE	LACTOSE	SACCHAR.	MALTOSE	MANNITE
Dim.	+	—	—	+	+
Mar.	+	—	—	+	+
Gr. R.	+	—	—	+	+
Waut.	—	—	—	+	+
Frat.	+	—	—	—	—

REMARQUE : + indique qu'il y a fermentation et — qu'elle fait défaut.

Dans tous les milieux où le sucre subissait la décomposition, le contenu des tubes prenait une coloration rouge et la nutrose y subissait la coagulation.

Ainsi qu'il résulte des recherches mentionnées dans le tableau ci-dessus, quatre des cinq souches examinées faisaient fermenter comme le bacille suiptestifer, le glucose, le maltose et la mannite et une ne faisait fermenter que le glucose.

Cette dernière souche différente du bacille suiptestifer, au point de vue du pouvoir fermentatif, se distingue également de la souche « Voldagsen », étant donné que celle-ci décompose le glucose et le maltose.

Quoique nous ayons toujours obtenu le même résultat dans des essais de fermentation répétés à des intervalles de plusieurs semaines, nous ne croyons pas qu'il y ait lieu de distinguer les unes des autres ces souches de paratyphus et cela, parce que nous considérons le pouvoir fermentatif de ces germes comme insuffisamment stable pour servir de base à une différenciation. Les microbes de ce groupe peuvent perdre dans certaines conditions l'une ou l'autre de leurs propriétés fermentatives pour, éventuellement, les reprendre dans la suite (mutations).

L'un (1) de nous a décrit un fait analogue pour les bacilles pseudo-dysentériques.

Malgré cette différence dans les propriétés fermentatives, comme nous l'avons déjà indiqué, toutes ces souches étaient

(1) BRUYNOCHE. *C. R. de la Soc. belge de Biol.*, 1920.

également agglutinées par les sérums anti-Wil. et anti-Frat. Il en était de même de la souche « Voldagsen » obligeamment mise à notre disposition par Cominotti.

D'après les indications de cet auteur italien, la souche Voldagsen n'est pas à distinguer sérologiquement du *Bacillus suispestifer*. Dans nos essais cette distinction s'imposait ainsi qu'il résulte du tableau ci-dessous :

CULTURES	SÉRUM ANTISUIPESTIFER						
	1/50	1/100	1/300	1/400	1/800	1/1.600	Contrôle
B. suispestifer	+++	+++	+++	++	+	?	—
B. typhus des souris . . .	+++	+++	+++	++	+	?	—
B. enteritidis Gärtner . .	+++	+++	+++	++	+	—	—
B. Voldagsen.	—	—	—	—	—	—	—
Dim.	—	—	—	—	—	—	—
B. Waut. . .	—	—	—	—	—	—	—

Nous croyons que cette différence dans les essais d'agglutination doit s'expliquer par la nature du bacille suispestifer employé. Si nous avions utilisé, pour la préparation du sérum antisuispestifer, des bacilles paratyphiques identiques à nos souches Dim. Mar. Waut, etc., il est évident que nous aurions obtenu des résultats tout à fait semblables à ceux de Cominotti. Comme nous l'avons déjà écrit, nous croyons qu'il ne faut pas identifier ces souches avec le bacille suispestifer authentique.

Quant à la virulence des bacilles en question, les souches pourvues de propriétés fermentatives pour les trois sucres (glucose, maltose et mannite) étaient les plus virulentes; elles étaient pathogènes, dans tous les essais, pour les cobayes et les souris. La virulence de la souche Voldagsen et de notre souche Frat. était atténuée pour ces animaux : la culture Voldagsen tuait encore les souris et était sans action pour les cobayes; la culture Frat. n'était pathogène que pour des jeunes souris. Cette dernière souche avait été isolée du poumon d'un porc mort dont l'autopsie avait révélé l'existence de foyers de pneumonie vermineuse et de petits foyers congestionnés de broncho-pneumonie.

Quant à l'action pathogène pour les porcs, étant donné le coût actuel de ces animaux, nous n'avons pas pu faire toutes les recherches projetées et nous avons dû nous contenter de quelques essais. La culture Vaut. inoculée à la dose d'un cent. cube dans la veine marginale de l'oreille d'un porc de 20 à 25 kilos, l'a tué au bout de vingt-quatre heures. Il présentait à l'autopsie un épanchement pleural séreux bilatéral et des foyers multiples de broncho-pneumonie. Un autre animal injecté par voie sous-cutanée avec 3 cent. cubes de la culture Mar. conservée depuis plusieurs mois au laboratoire, n'a présenté qu'une indisposition passagère (toux, amaigrissement) de cinq à six jours.

CHAPITRE III

BACILLE NON IDENTIFIÉ

Nous avons isolé ce bacille une fois au cours des recherches récentes et quatre fois au cours des analyses exécutées en 1918. Nous avons trouvé ce microbe dans les lésions pulmonaires d'animaux atteints de pleuro-pneumonie. Ces lésions étaient tellement caractéristiques que macroscopiquement elles se différenciaient d'emblée de celles produites par le bacille paratyphique. Elles étaient très vastes et le poumon au niveau de ces foyers était complètement hépatisé (hépatisation grise) et en imposait pour du tissu qui avait subi l'ébullition. La plèvre était également enflammée, épaissie et adhérente surtout au niveau des parties hépatisées. Dans un cas, nous avons constaté, en dehors des foyers décrits, plusieurs tubercules grisâtres au niveau des sommets pulmonaires.

Etant donnée la nature des lésions, notre première impression était que nous avions affaire à de la pleuro-pneumonie contagieuse, vu surtout que l'examen microscopique des frottis du poumon y montrait une masse de bacilles présentant assez bien la coloration bipolaire. A côté de ces microbes qu'on aurait à la rigueur pu prendre à première vue pour une variété de *pasteurella* (le *Bacillus suisepeticus* de Schütz) (1), il y avait d'autres éléments qui avaient un aspect tout différent : des

(1) SCHÜTZ. *Arb. a. d. Ges.-Amt.*, 1886.

coccus, de gros diplocoques rappelant par leur forme les pneumocoques, des bacilles plus ou moins longs dont quelques-uns présentaient des irrégularités rappelant un peu les divisions des moisissures. Comme nous le verrons dans la suite, toutes ces formes n'étaient pas l'indice d'une infection associée, mais provenaient du polymorphisme du bacille en question. Nous n'avons pas affaire non plus à une moisissure plus ou moins banale, car, quelle que fût la méthode de coloration employée, nous n'avons jamais pu mettre d'éléments nucléés en évidence dans les bacilles envisagés.

Pour procéder avec ordre dans la description de ce germe, nous indiquerons successivement ses caractères de culture, son action pathogène, et nous donnerons pour terminer quelques caractères de différenciation entre ce microbe et quelques autres germes pathogènes pour le porc.

Notre bacille pousse mal sur gélose ordinaire. Les premiers ensemencements donnent toutefois, surtout quand ils sont pratiqués avec du sang du cœur d'un animal mort à la suite de l'inoculation expérimentale, un développement assez abondant. Au bout de 18 à 24 heures d'étuve, il se produit des colonies arrondies légèrement opalescentes au début, ayant environ un millimètre de diamètre. Repiquées sur un autre tube de gélose, pourvu que l'ensemencement ait été massif, il se produit encore du développement assez marqué, mais au fur et à mesure que les réensemencements se succèdent, la culture devient de moins en moins abondante pour finalement ne plus se faire, surtout quand les repiquages se font un peu irrégulièrement.

A l'examen microscopique de ces cultures, on trouve des éléments très différents : des bacilles longs de 2 à 10 μ ayant les extrémités nettement arrondies, tantôt isolés, le plus souvent placés par deux, quelquefois en chaînettes de 3 à 5 éléments. Leur largeur varie de 0,5 à 0,8 μ . Les éléments très allongés sont souvent un peu incurvés et quelques-uns présentent des parties plus renflées. On trouve aussi dans ces cultures des formes de gros coques isolés ou associés par deux. Certains éléments présentent un début de segmentation ressemblant un peu à la division des moisissures.

Quand on ensemence de la gélose avec une culture en bouil-

lon, il ne se produit habituellement aucun développement, alors que cette culture repiquée sur bouillon pousse normalement.

Ces bacilles ou coques prennent uniformément la matière colorante, sont Gram négatifs et immobiles.

Dans le bouillon, il se produit un trouble uniforme ressemblant au développement du bacille du rouget, mais s'en distinguant par le fait qu'il est plus abondant. A la longue, le bouillon s'éclaircit un peu et il se produit une sédimentation au fond du tube. Il ne se forme jamais de voile à la surface.

Au bout de quelques jours d'étuve, la culture fournit toujours très nettement la réaction de l'indol et elle dégage une odeur très semblable à celle des cultures de choléra. Dans le bouillon, les cultures restent en vie durant plusieurs semaines.

Nous n'avons jamais constaté de sporulation.

Sur sérum coagulé, le bacille se développe sans peptoniser le milieu.

Le lait n'est pas coagulé.

Sur pommes de terre, il se produit un fin enduit plus ou moins luisant.

Le microbe ne se développe pas à la température ordinaire, il ne liquéfie pas la gélatine et pousse le mieux en milieu aérobie.

Ce bacille est très virulent pour le cobaye. Il suffit de lui injecter une fraction de centimètre cube de culture pour le tuer. La mort survient plus ou moins rapidement suivant la dose inoculée et la voie choisie pour cette injection. La voie intrapéritonéale est la plus sévère.

Quand l'injection s'est faite sous la peau, il se produit à l'endroit de l'injection un foyer purulent. Le péritoine, la plèvre et le péricarde sont habituellement remplis de pus. Les poumons sont congestionnés et, quelquefois, on constate des adhérences pleurales. Le bacille se trouve dans tous les organes. On en trouve des masses dans le péritoine. La plupart ont la forme de bacilles assez allongés avec des extrémités plus ou moins effilées et plus intensément colorées que le centre.

Ce microbe est très peu pathogène pour la souris et il faut de grandes quantités de culture pour la tuer. Quand elle succombe à la suite d'une injection massive, on n'y constate ni

suppuration, ni épanchement purulent, et les organes contiennent très peu de bacilles.

Quand nous envisageons les caractères de ce bacille, nous ne pouvons l'identifier avec aucun des germes pathogènes décrits.

Il existe tant de différence entre ce microbe et les bacilles du rouget et du paratyphus, qu'il n'y a pas lieu de mentionner les caractères de différenciation. Cette mention est seule d'utilité pour le *Bacillus suisepcticus* de Schütz et le *Bacillus hyopyogenes* de Grips.

Le *Bacillus suisepcticus* se distingue de notre germe par les particularités suivantes :

1° Il est beaucoup plus court et, dans les exsudats, ses extrémités sont bien arrondies et non effilées ;

2° Il produit dans le bouillon un trouble uniforme et un léger voile à la surface ; sur pommes de terre il n'y a pas de développement ;

3° Il est pathogène pour les souris et le lapin sans l'être pour le cobaye.

Le *Bacillus hyopyogenes* de Grips a comme caractères distinctifs :

1° D'être beaucoup plus court, Gram positif, et de ne pas présenter de coloration bipolaire ;

2° De coaguler le lait et de peptoniser le sérum coagulé ;

3° De ne pas être pathogène pour le cobaye.

VACCINATION

Nous avons utilisé comme vaccin, suivant les cas, des cultures tuées, soit de paratyphus, soit de paratyphus et du bacille décrit dans le chapitre précédent. La concentration de l'émulsion était telle qu'elle se rapprochait sensiblement de celle utilisée en médecine humaine, soit un milliard de germes par centimètre cube.

Les animaux ont reçu deux ou trois injections de doses variant de 1 à 3 cent. cubes suivant leur poids. Ces vaccinations n'ont été faites que dans des exploitations infestées, sur des

porcs indemnes de manifestations morbides évidentes au moment des injections.

Nous ne pouvons pas nous prononcer définitivement sur la valeur de cette méthode étant donné que, d'une part, nos essais n'ont pas été assez nombreux et que, d'autre part, nous avons dû nous fier dans la plupart des cas, pour apprécier l'effet, aux renseignements souvent incomplets fournis par les praticiens. Pour autant que nous avons réussi à les recueillir, l'appréciation a toujours été favorable.

Dans un cas, nous avons pu instituer une vaccination dans des conditions telles qu'elle constitue en quelque sorte une expérience.

Voici sommairement les détails de cet essai.

En 1918, éclate dans une porcherie du Comité National (Lovenjoul) une maladie qui faisait journellement des victimes dans l'établissement.

L'un de nous fut chargé d'examiner, au point de vue bactériologique, les organes des animaux morts. Il y trouvait, outre le bacille paratyphique spécial qu'il avait déjà isolé dans d'autres foyers épizootiques, le bacille non identifié décrit au chapitre III.

Il a préparé alors un vaccin constitué de cultures de ces deux microbes que son ami, le vétérinaire Missoul, a injecté trois fois à tous les animaux. On n'a pris aucune autre mesure de prophylaxie et on n'a rien changé au régime. Après la seconde injection de vaccin, il n'y a plus eu qu'un seul décès.

A partir de ce moment, dans cette porcherie où il y avait environ une centaine d'animaux et où il se produisait avant régulièrement 3 ou 4 décès (quelquefois plus) par semaine, tous les porcs sont restés dans la suite sans accidents.

Ces résultats très encourageants méritent, nous semble-t-il, d'instituer en l'occurrence de nouveaux essais pour permettre de juger définitivement la valeur de cette vaccination. Nous croyons même que, quand on tient compte du fait qu'il est si difficile et souvent même impossible de distinguer cliniquement le rouget du paratyphus du porc et éventuellement d'autres affections, qu'il y aurait avantage d'associer à la vaccination contre le rouget celle contre le bacille paratyphique, et cela

parce que ce microbe intervient si fréquemment comme agent pathogène chez ces animaux.

En agissant ainsi, on utiliserait une mesure prophylactique de portée plus générale que celle de la simple vaccination contre le rouget. Sans aucun doute, on aurait moins d'échecs. Car il n'est pas rare de voir appliquer la vaccination contre le rouget, comme mesure prophylactique, pour des infections paratyphiques et évidemment sans le moindre succès.

LA CONCENTRATION OPTIMA EN IONS HYDROGÈNE FAVORISANT LE DÉVELOPPEMENT DE CERTAINS MICRO-ORGANISMES

par K. G. DERNBY,
de Stockholm (Suède).

(Travail du laboratoire de M. Levaditi à l'Institut Pasteur.)

INTRODUCTION

C'est un fait bien connu que la réaction du milieu joue un rôle important pour le développement des micro-organismes : quelques-uns d'entre eux préfèrent une réaction alcaline, d'autres une réaction acide ou neutre, et quelques bactéries même supportent des degrés élevés d'acidité ou d'alcalinité. On trouve dans tous les manuels des indications précises pour déterminer l'acidité ou l'alcalinité convenable du milieu. Presque toujours on opère de la façon suivante : le bouillon est neutralisé au tournesol ou à quelque autre indicateur et on ajoute ensuite quelques centimètres cubes de NaOH. Mais d'après le travail classique de Sørensen (1909), il est évident que le titrage d'acidité ou d'alcalinité n'indique pas la vraie acidité ou alcalinité, c'est-à-dire la concentration des ions (H) ou (OH) de la solution (1).

Pour mesurer cette concentration des ions (H), Sørensen avait préconisé deux méthodes : électrique et colorimétrique. Depuis dix ans ces méthodes ont créé une nouvelle ère dans la chimie physiologique. Cependant elles n'ont été employées en bactériologie que récemment, et ceci est dû à ce que la méthode électrométrique est un tant soit peu compliquée et que, dans la zone de neutralité, où la plupart des bactéries se développent,

(1) pH est le symbole proposé par Sørensen pour exprimer l'acidité ou l'alcalinité d'un milieu. Il est mathématiquement le logarithme négatif, de base 10, de la concentration en ions hydrogène. Ainsi $pH = 7$ veut dire, une concentration en ions hydrogène $= 10^{-7}$, c'est-à-dire 0,000.000.1.

elle ne donne pas toujours des résultats satisfaisants, par suite de l'acide carbonique qui se dégage. Il était impossible au commencement d'employer la méthode colorimétrique de Sørensen parce que l'indicateur coloré, proposé par lui, introduisait, une erreur due à la présence des protéines, ce qui rendait impossible l'emploi de cette méthode dans des solutions qui contenaient des substances albuminoïdes.

Nous devons au chercheur américain William Mansfield Clark d'avoir adapté la méthode colorimétrique de Sørensen à un but bactériologique, en préparant une série d'indicateurs donnant un minimum d'erreurs. Les travaux de Clark et Lubs (1917) sont maintenant considérés comme classiques, et spécialement en Amérique et en Angleterre, et Ponselle vient, dans le *Bulletin de l'Institut Pasteur* (1920), d'attirer sur eux l'attention des bactériologistes français.

Leur importance réside dans le fait qu'ils permettent de fixer d'une façon certaine la réaction initiale d'un milieu de culture. Par suite, si nous préparons deux bouillons de viande de la même manière et si nous ajoutons, par exemple, dans chaque ballon 20 cent. cubes de NaOHn . par litre, il n'est nullement certain *a priori* que la concentration (H) sera la même dans les deux cas. Les bactériologistes connaissent bien les grandes difficultés qu'on a à préparer un milieu de culture pour des microbes très sensibles à l'acidité ou à l'alcalinité du milieu.

Quand on ensemence dix bouillons préparés exactement d'après les mêmes prescriptions et titrés au même degré d'alcalinité, avec le bacille diphtérique, souvent quelques-uns seulement fournissent une bonne culture. Il en est de même pour le pneumocoque. Dernby et ses collaborateurs ont étudié l'influence de la concentration d' (H) (Dernby et Avery; D. et David) pour ces deux microbes et ont trouvé qu'il est indispensable de contrôler la concentration (H).

Les premiers travaux sur les rapports entre la concentration (H) et la vie des bactéries eurent trait à la « valeur limite de pH », qui fut considérée comme un facteur significatif dans la classification des micro-organismes. Citons, comme exemple, les recherches de Michaelis et Marcora, et aussi de Clark pour le *B. coli*; Ayers (1916), Cullen et Avery pour le *streptocoque* et Itano (1916) pour le *Bacillus subtilis*. On trouva

ainsi que certains microbes, en se développant, produisaient des acides et que la valeur finale de pH était plus ou moins constante.

Cependant on formula des objections à la théorie de la « limite acide » (par exemple Jones 1919). Il a été démontré que les deux « limites d'acidité et d'alcalinité » dépendent de plusieurs facteurs ; constituants du milieu, présence des sucres, temps d'incubation, etc...

Ce qui est plus important c'est de déterminer la valeur optima pH , comme je l'ai exposé. J'ai d'abord étudié cette valeur pour le développement du bacille diphtérique et du pneumocoque, et j'ai constaté que la zone pH , dans les limites de laquelle les bactéries poussent, est plutôt étroite ; or, ces deux bacilles modifient la concentration d' (H) du milieu pendant leur développement. La réaction initiale devra donc toujours être déterminée, pour que les microbes puissent se développer dans des conditions optima.

Il en résulte l'importance de la *courbe de croissance* en relation avec pH . Nous représentons le degré de croissance en ordonnée et le pH en abscisse, de telle sorte que les limites de pH seront représentées par les points zéro, et pH optima par le maximum. Les « limites » peuvent varier et l'optimum aussi, mais dans son aspect général la courbe sera presque constante et constituera un élément utilisable dans la définition des espèces bactériennes.

Il serait désirable que les anciennes définitions employées dans les manuels de bactériologie, par exemple « B. X. pousse mieux dans les réactions faiblement alcalines », soient remplacées par les suivantes : « B. X. se développe pour pH , 6,0-7,5-8,5 » (le premier et le troisième chiffre étant les limites approximatives et le deuxième l'optimum).

Il est presque certain que la courbe de croissance établie pour la gélatine ou la gélose ne sera pas la même que pour le bouillon.

Les chiffres obtenus ne sont strictement valables que pour le milieu employé. Jones (1919), à propos de nos recherches sur le pneumocoque (Dernby et Avery), soutient que la limite pour le développement de ce microbe ($pH = 7$) aurait été plus acide, par exemple $pH = 6$, si nous avions ajouté du sucre ou

du sang au bouillon. Ceci est fort possible, mais nous avons précisément évité l'emploi du sucre, pour obtenir un optimum rigoureux et éviter ainsi une trop grande augmentation d'acidité au cours des essais. Cependant le travail de Jones montre que nous devons être très prudents en considérant comme facteur absolu la valeur limite de pH .

MÉTHODES.

a) *Préparation du milieu.*

On doit choisir un milieu approprié, de préférence liquide afin de pouvoir facilement mesurer la concentration (H), et en deuxième lieu, il ne doit pas contenir de substances fermentescibles qui par production d'acide peuvent déterminer une modification de la concentration (H).

Un tel milieu est le bouillon de viande autolysé : 9 échantillons préparés à l'acide de ce milieu furent employés; tous contenaient la même quantité de bouillon, mais des proportions différentes d' HCl ou $NaOH$ afin d'obtenir des concentrations (H), différentes pouvant être facilement reproduites.

Dans cette méthode toutes nos expériences ont été exécutées d'une façon uniforme, et par ce moyen, beaucoup d'erreurs furent évitées.

1 kilogramme de viande finement hachée fut plongé dans deux litres d'eau ordinaire et maintenu à la température de 37° pendant vingt-quatre heures pour l'autolyse, ensuite bouilli et filtré. On y ajoute 0,5 p. 100 de $NaCl$ et 0,5 p. 100 de peptone, puis on stérilise pendant vingt minutes à 110° .

Le bouillon fut divisé en parties égales et versé dans 9 ballons, dans lesquels différentes quantités de HCl ou $NaOH$ furent ajoutées, afin d'obtenir une série de concentrations (H) définies. Le tableau n° I indique la composition des 9 milieux-types, ainsi obtenus :

Il est avantageux de préparer une grande quantité de bouillon pour avoir des résultats comparables. Les chiffres du tableau ne sont valables que pour le bouillon utilisé, pour une nouvelle fabrication les valeurs pH doivent être vérifiées.

Le contenu des 9 ballons fut alors divisé en neuf séries de tubes à essai, 10 cent. cubes et tous les tubes furent stérilisés. On les laissa une journée à la température ambiante, afin d'obtenir une concentration stable en ions hydrogène.

TABLEAU I.

30 c.c. bouillon + HCl ou NaOH + H ² O = 32 c.c.				
N ^o	c. c. N NaOH	c. c. N HCl	c. c. H ₂ O	pH 24 heures après stérilisation
1	—	1.8	0,2	3,1
2	—	1.0	1,0	4,0
3	—	—	2,0	4,9
4	0,3	—	1,7	6,0
5	0,6	—	1,4	6,5
6	0,9	—	1,1	7,0
7	1,2	—	0,8	7,5
8	1,4	—	0,6	8,0
9	1,6	—	0,2	8,6

*b) Effet de la stérilisation sur la concentration (H)
de bouillons mixtes.*

Il y a certaines difficultés pour déterminer exactement la concentration en ions hydrogène, et ceci est dû ordinairement aux changements de pH, causés par la stérilisation. Spécialement, lorsque le bouillon est fermenté, ces changements peuvent être considérables, comme l'indique les chiffres suivants :

pH avant la stérilisation.	7,0	7,3	7,6
pH immédiatement après la stérilisation .	7,3	7,6	8,2

L'explication probable de ce phénomène est la suivante : dans le bouillon fermenté, nous avons un équilibre entre les composés : carbonate de soude, bicarbonate de soude et CO². En chauffant, le mélange de CO² combiné ou libre de la solution sera dégagé, augmentant ainsi la concentration relative du carbonate de soude et rendant par ce moyen la réaction plus alcaline.

Mais si les ballons stérilisés ne sont pas mis en expérience immédiatement après refroidissement, mais deux ou trois jours après la stérilisation, on n'observera aucune augmentation d'alcalinité, la concentration en ions hydrogène étant pratiquement la même deux jours après comme avant la stérilisation, ainsi que l'indiquent les chiffres suivants :

pH avant la stérilisation.	7,0	7,3	7,6
pH 48 heures après la stérilisation	7,0	7,3	7,6

Ceci s'explique par le fait que pendant ce temps le CO² de l'air est absorbé et qu'un équilibre s'est rétabli à la température de la chambre froide entre le carbonate de soude, le bicarbonate de soude et le CO² libre.

Il est donc essentiel que les milieux de culture ne soient pas employés immédiatement après la stérilisation, mais bien après vingt-quatre heures au moins de repos.

c) *Examen du développement microbien.*

Les tubes sont ensemencés avec la même quantité d'une culture de vingt-quatre heures du micro-organisme examiné. Après un certain temps, le degré de croissance a été établi. La numération des colonies n'a pas été faite, mais on se borna à estimer s'il y avait formation de voile ou de trouble. Afin de représenter graphiquement les résultats, nous avons exprimé le degré de développement par des chiffres, au lieu de signes; c'est ainsi que 1 correspond à +, 2 à ++, etc.

On peut objecter que cette méthode est plus ou moins arbitraire, mais ceci n'est que secondaire; ce que nous voulons savoir, ce sont les valeurs de pH pour les limites et l'optimum du développement. Nous avons exécuté un grand nombre d'expériences parallèles, mais nous nous bornons à reproduire ici les courbes seulement.

Il est évident que les premières lectures de six et seize heures donnent la valeur optima en pH, tandis que les lectures de quarante-huit heures ou plus donnent les valeurs limites en pH.

Les courbes de la figure 1 indiquent les deux points: les valeurs limites pH et la valeur optima pH. Le gros trait indique la « courbe de croissance », telle qu'elle est donnée dans la figure 4.

TABLEAU II. — *Staphylococcus Boucicaut (Legroux).*

NUMÉRO	pH		DEGRÉ DE CROISSANCE APRÈS		
	Initial	Après 48 h.	8 heures	16 heures	48 heures
1	3,0	3,0	0	0	0
2	4,0	4,0	0	0	0
3	4,9	4,9	0	1	4
4	5,9	6,0	0	2	4
5	6,5	6,5	1	3	4
6	7,0	6,8	2	4	4
7	7,5	7,3	2	4	4
8	8,0	7,7	1	3	4
9	8,6	8,6	0	0	0

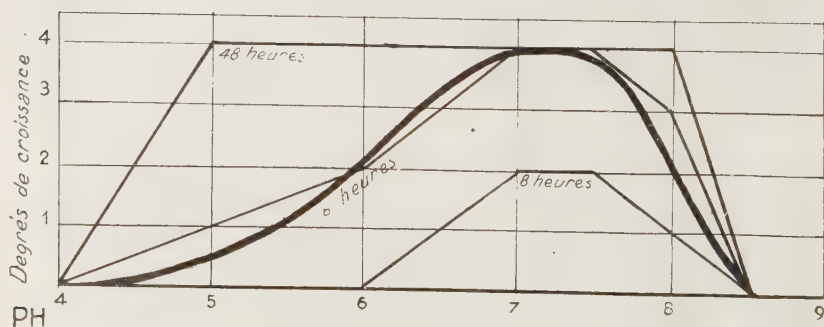


FIGURE 1.

d) *Détermination de la concentration en ions H.*

Pour déterminer les valeurs pH, nous avons employé la méthode colorimétrique de Sørensen et les indicateurs de Clark et Lubs. Dans ce court travail, il est impossible de décrire la manière complète de procéder, et c'est pourquoi nous nous permettons de nous référer aux travaux de Sørensen (1909), Michaelis (1914) et Clark et Lubs (1919).

Les indicateurs employés furent :

	Zone de pH
Bleu de thymol.	1,2 — 2,8
Bleu de bromo-phénol	2,8 — 4,6
Rouge de méthyle	4,4 — 6,0
Rouge de propyle.	4,8 — 6,4
Pourpre de bromo-crésol.	5,2 — 6,8
Bleu de bromo-thymol	6,0 — 7,6
Rouge de phénol	6,8 — 8,4
Rouge de crésol	7,2 — 8,8
Phtaléine du crésol.	8,2 — 9,8

Les solutions de contrôle furent celles proposées par Sørensen.

1° HCl.	1/10 mol.
2° Citrate de soude	1/10 —
3° KH_2PO_4	1/15 —
4° $\text{Na}^2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1/15 —

La pureté des produits fut contrôlée par la méthode électrométrique.

En principe, toutes les solutions employées en bactériologie sont colorées ou troubles; ou l'un et l'autre, et c'est pourquoi certaines précautions doivent être prises afin de corriger la couleur ou le trouble des solutions. La méthode proposée par Walpole (1915) pour l'emploi d'un *comparateur* paraît être la meilleure.

Schématiquement, la méthode de Walpole est expliquée par la figure 2.

Derrière les tubes contenant les solutions de contrôle sont placés les tubes contenant les solutions d'épreuve. Dans tous les tubes de la première rangée on ajoute la même quantité d'indicateur. La couleur des solutions d'épreuve est la couleur corrigée.

La figure 3 donne un modèle de porte-tubes que l'auteur a employé et où la lumière réfléchie est employée au lieu de la lumière directe.

Cette méthode donne des résultats exacts et elle est très facile à effectuer. La valeur de pH peut être déterminée avec une approximation de 0,1.

Pour chaque expérience une série de tubes ensemencés fut employée, dont les valeurs de pH ont été préalablement déterminées.

Après incubation, la concentration (H) dans les tubes ensemencés fut de nouveau mesurée, et si quelque changement apparaît il est noté dans le compte rendu des expériences.

En fait, en employant le bouillon autolysé comme il a été décrit, il n'y a pas grande modification de la valeur pH au cours du développement.

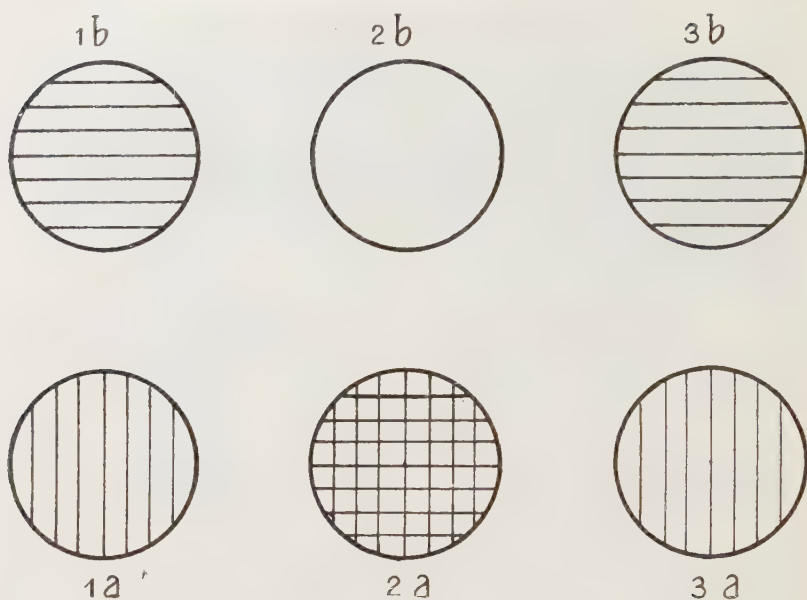


FIG. 2. — Schéma de Walpole :

- 1 a et 3 a, Solutions standardisées, dont le pH est connu, indicateur ajouté;
 2 a, Liquide d'épreuve coloré par l'indicateur;
 1 b et 3 b, Liquide d'épreuve sans indicateur;
 2 b, Eau distillée.

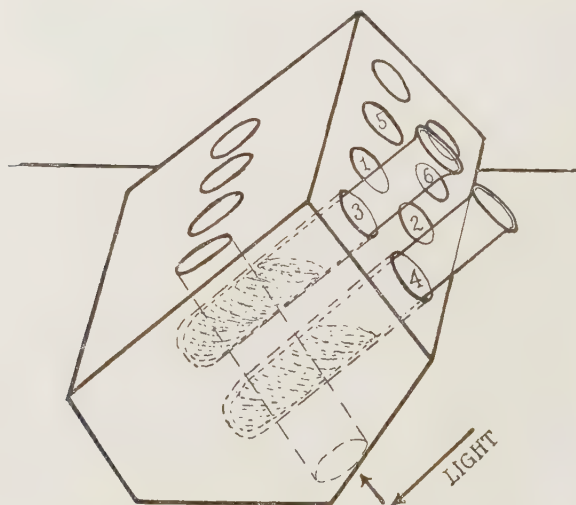


FIG. 3. — Appareil pour déterminer les concentrations des ions hydrogène dans les solutions colorées ou troubles (*Light* = lumière).

RÉSUMÉ DES RÉSULTATS.

Il n'est guère possible de reproduire ici *in extenso* tous les protocoles d'expériences. Ils sont tous du type que présentent le tableau II et la figure 1. Les résultats sont résumés dans le tableau III et les figures 4 a et 4 b.

TABLEAU III.

NOMS DES MICROBES	LIMITES pH	pH OPTIMA	OBSERVATIONS
<i>B. diphteriæ</i>	6,0-8,3	7,3-7,6	Voir Dernby et David (1921) et Bunker (1919).
<i>B. tuberculosis</i> de cheval . .	6,0-7,6	6,8-7,2	Cultivé dans un bouillon avec et sans glycérine.
<i>B. typhosus</i>	6,2-7,6	6,8-7,2	Remarquer la zone de croissance étroite pour le <i>B. typhosus</i> , <i>B. coli</i> étudié avant par Michaelis et Marcora (1919) et Clark et Lubs (1917).
<i>B. coli communis</i>	4,4-7,8	6,0-7,0	
<i>B. para A.</i>	4,5-7,8	6,4-7,0	
<i>B. para B.</i>	4,5-8,0	6,4-7,2	
<i>B. suipestifer</i>	5,0-8,2	7,0-7,6	
<i>Pyocyanus</i>	5,6-8,0	6,6-7,0	
<i>Proteus vulgaris</i> M	4,4-8,4	6,0-7,0	
— D			
— Ch			
<i>Prodigiosus</i>	5,0-8,0	6,0-7,0	
<i>Vibrio cholerae</i>	6,4-7,9	7,0-7,4	
<i>Cinnabareus</i>	5,0-7,8	6,0-7,0	
<i>Pneumococcus</i> (types I, II, III) .	7,0-8,3	7,8	Voir Dernby et Avery (1918). Remarquer la petite zone de croissance. Jones a démontré (1919) que la zone en milieu acide donne au pH 6,0 si le glucose est présent et même descend à 5,0 si on ajoute du sang.
<i>Streptococcus liquefaciens</i> . .	5,5-8,0	6,2-7,0	Pour d'autres espèces de streptocoques voir Ayers (1916), Itano (1916), Cullen et Avery (1919) et Svanberg (1918).
<i>Staphylococcus</i> doré	5,6-8,1	7,2-7,6	Tous les types de ce groupe donnent une diminution d'alcalinité.
— blanc	5,6-8,1	7,2-7,6	
— rouge	5,6-8,1	7,2-7,6	
— Boucicaut	4,8-8,0	7,0-7,6	
— <i>neoformans</i>	5,0-8,0	6,5-7,1	

NOMS DES MICROBES	LIMITES pH	pH OPTIMA	OBSERVATIONS
<i>Gonococcus</i>	6,0-8,3	7,3	Etudié par l'auteur et le Dr Hedén. Voir Hedén (1920). Milieu : Agar-ascite. Le gonocoque produit une forte acidité. — Voir aussi Cole et Lloyd (1917).
<i>B. subtilis</i>	4,5-8,5	6,0-7,5	Voir Itano (1916) qui cependant a trouvé des limites parfois plus larges.
<i>B. anthracis</i>	6,0-8,5	7,0-7,4	
<i>B. anthracoides</i>	6,0-7,8	6,8-7,2	
<i>Coccobacille de Pfeiffer</i>	6,2-7,6	7,0	Milieu avec extrait de globules sang unis.
<i>B. pestis</i>	5,6-7,5	6,5-7,4	Fourni par M. Dujardin-Beaumetz.
Groupe des anaérobies :			
<i>B. sporogenes</i>	5,8-8,5	6,0-7,6	En collaboration avec le Dr J. Blanc. Voir obs. Blanc (1921). Milieu + sulfure de calcium.
<i>B. histolyticus</i>			
<i>B. canadiensis</i>			
<i>B. putrificiens</i>			
<i>B. perfringens</i>			
<i>B. tetani</i>	5,5-8,3	7,0-7,6	En collaboration avec le Dr B. Allander.

FIGURE 4 a.

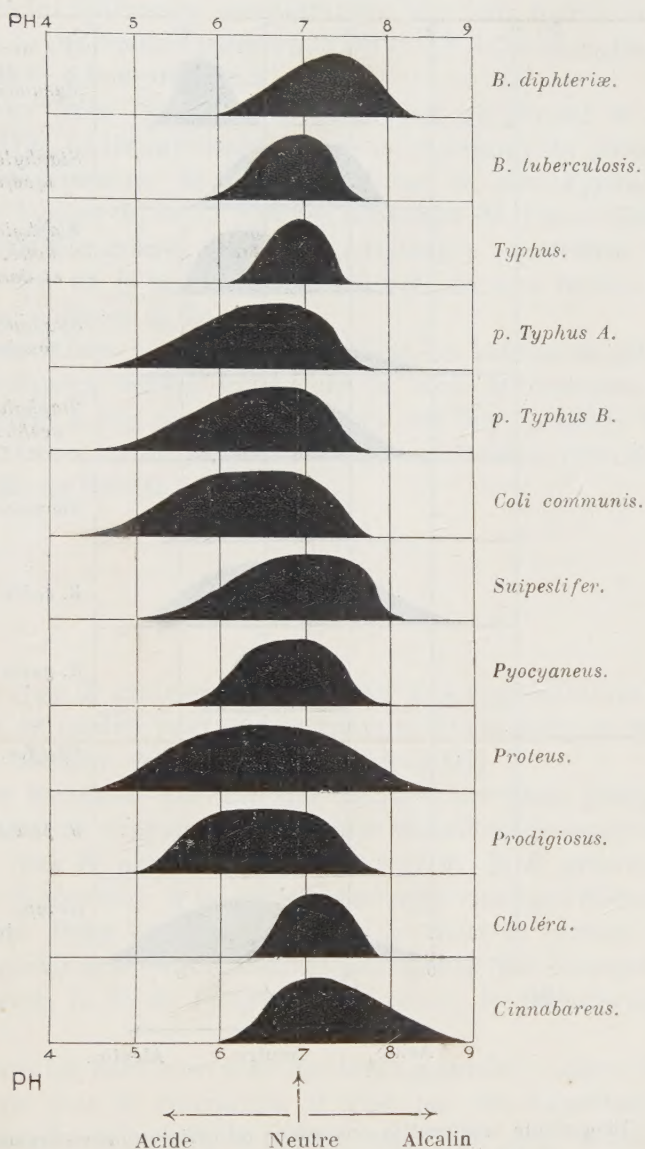


Diagramme montrant la croissance de certains micro-organismes en fonction de la concentration des ions hydrogène.

FIGURE 4 b.

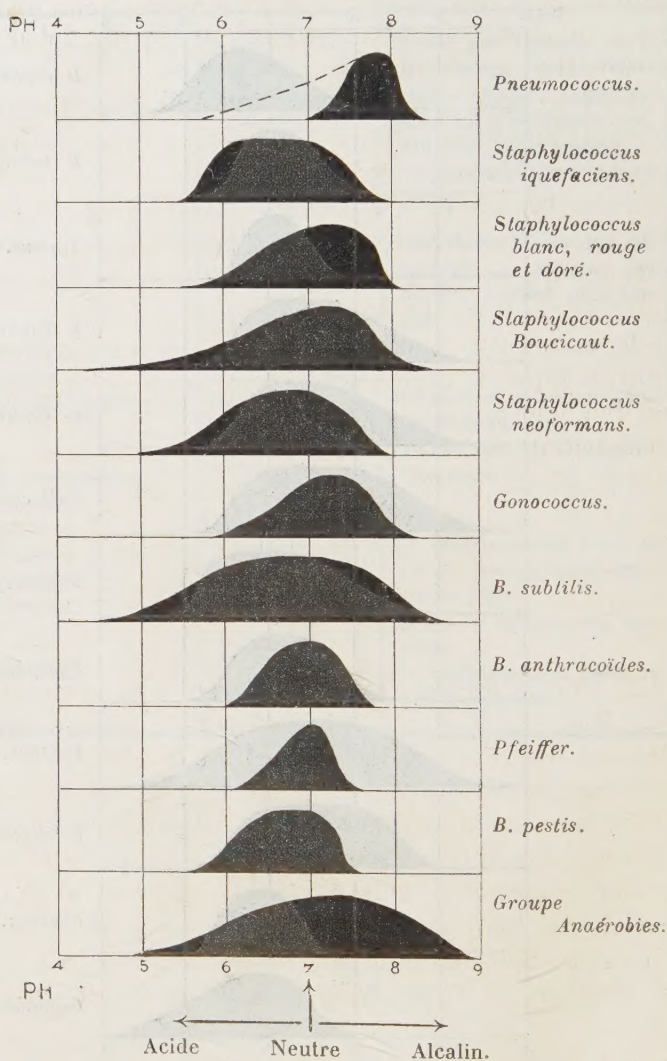


Diagramme montrant la croissance de certains micro-organismes en fonction de la concentration des ions hydrogène.

Après avoir fini ce travail, j'ai étudié, en collaboration avec M. le Dr B. Allander, la culture du bacille tétanique en relation avec les différentes concentrations des ions hydrogène et nous en avons trouvé l'optimum à $pH=7,0-7,6$ et les limites entre $pH=5,5$ et $pH=8,3$.

Je veux aussi citer encore un travail de Fennel et Fischer (1919), où ils ont étudié la zone de croissance du pneumocoque en bouillon, et des *B. typhosus*, *B. para-Typhus A*, *B. para-Typhus B*, le *B. Pfeiffer*, ainsi que du *Vibrio cholerae* sur gélose. Sur gélose, la zone de croissance paraît être plus étendue que ne le montrent les résultats de mes recherches, faites sur cultures en bouillon.

Je tiens à faire encore remarquer que les valeurs de pH qui sont indiquées comme limites de la zone de croissance la restreignent à son minimum, et qu'il est bien possible que, dans certaines conditions, cette zone de croissance s'étende en dehors de ces limites.

CONCLUSIONS

1° La zone de croissance par rapport à la concentration des ions H a été étudiée pour une quarantaine de micro-organismes, dans un bouillon sans sucre (Voir tableau III).

2° Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes : 1° les bactéries supportant de grandes variations de concentration en ions H (par exemple, le *B. subtilis*, le *B. proteus*, et certains *anaérobies*) ; 2° les bactéries ne supportant que d'étroites variations. Dans ce dernier groupe se trouvent certains des plus importants micro-organismes pathogènes (par exemple, le *B. d'Eberth*, le *B. de Pfeiffer*, le *B. pestis*, le *pneumocoque*, etc.).

3° Pour les bactéries dont le développement s'opère dans une large zone de croissance, il n'est pas très important de déterminer la valeur pH du milieu, mais cette détermination, faite d'une manière rigoureuse, est absolument nécessaire pour celles dont la zone est étroite. D'où la nécessité de déterminer les valeurs pH « limites et optima » pour chaque microbe, afin

de pouvoir toujours reproduire le même milieu, et obtenir ainsi un développement microbien constant.

Je tiens à exprimer ma gratitude à M. Levaditi, pour avoir mis son laboratoire à ma disposition, ainsi qu'à MM. Legroux et Dujardin-Beaumetz pour m'avoir donné les bactéries étudiées. Je veux aussi remercier mes amis et camarades MM. J. Blanc, G. Eliava, J. Jiminez, M. Rancovitch et A. Compton pour leur collaboration.

BIBLIOGRAPHIE

- S. H. AYERS. *Journ. Bacteriology*, 1916, **1**, p. 84.
J. BLANC. *Thèse*, Paris 1921.
J. W. M. BUNKER. *Journ. Bacteriology*, 1919, **4**, p. 379.
W. M. CLARK et H. A. J. LUBS. *Journ. Bacteriology*, 1917, **2**, p. 1; *Journ. Inf. Dis.*, 1915, **22**, p. 109.
S. W. COLE et J. LLOYD. *Journ. Path. Biol.*, 1917, **21**, p. 267.
G. CULLEN et O. T. AVERY. *Journ. exp. Med.*, 1918, **28**, p. 289; 1919, **29**, p. 215.
K. G. DERNBY et O. T. AVERY. *Journ. exp. Med.*, 1918, **28**, p. 345.
K. G. DERNBY et H. DAVID.
E. A. FENNEL et M. B. FISCHER. *Journ. Inf. Dis.*, 1919, **25**, p. 451.
K. HEDÉN. *Acta Dermato-Venereologica*, 1920, **1**, 198.
A. ITANO. *Mass. State Agricult. Station Bull.*, 1916, p. 167.
H. JONES. *Journ. Inf. Dis.*, 1920, **16**, p. 160 et 435.
L. MICHAELIS. *Wasserstoffionenconcentration*. Berlin, 1914.
A. PONSELLE. *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1920, **18**, p. 1.
S. P. L. SORENSSEN, *Enzymstudien II*, *Bioch. Zeitschr.*, 1909, **21**, p. 131.
O. SVANBERG. *Thèse*, Stockholm, 1918.

Le Gérant : G. MASSON.